



TITLE:

VCPの関わる酸化ストレス応答の分子機構(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

村上, 克洋

CITATION:

村上, 克洋. VCPの関わる酸化ストレス応答の分子機構. 京都大学, 2013, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2013-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12778>

RIGHT:

VCP の関わる酸化ストレス応答の 分子機構

村上 克洋

目次

要旨	1
略語表	3
序論	5
本論	
第一章 VCP のペルオキシソームタンパク輸送機構への関与	9
1-1 緒言	10
1-2 材料と方法	10
1-3 結果	14
1-4 考察(小活 1)	15
第二章 VCP の関わるペルオキシソームタンパク輸送メカニズムの解析	25
2-1 緒言	26
2-2 材料と方法	26
2-3 結果	27
2-4 考察(小活 2)	28
第三章 VCP と PEX19 の相互作用および各ノックダウンフェノタイプの解析	35
3-1 緒言	36
3-2 材料と方法	36
3-3 結果	37
3-4 考察(小活 3)	38
第四章 酸化ストレスによる catalase の局在変化と VCP の関わり	43
3-1 緒言	44
3-2 材料と方法	44
3-3 結果	45
3-4 考察(小活 4)	46

総括	54
参考文献	58
謝辞	67

要旨

VCP (valosin-containing protein)は AAA (ATPase associated with various cellular activities)ファミリーに属する ATPase で、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク分解やオートファジー、小胞体やゴルジ体における膜融合など、多彩な機能に関わる分子である。ヒトにおいては、神経変性疾患の発症に関わる VCP の遺伝子変異や、種々の癌組織における VCP の過剰発現などが見出されており、疾患関連タンパクとして位置付けられる。これらの背景から、VCP のさらなる機能解析を進めることによって、各種細胞内イベントの詳細な理解、さらには疾患メカニズムの基礎的な理解に貢献できることが期待される。本研究では、VCP の新規機能を明らかにすることを目的とし、各種オルガネラ局在型 GFP による細胞株モデルおよび RNAi を用いたアプローチを試みた。

RNAi による VCP ノックダウンに伴い、ペルオキシソーム局在型 GFP の局在変化が確認されたことから、ペルオキシソームタンパク輸送における VCP の関与が示唆された。PTS (peroxisome targeting signal)と呼ばれる N 末端あるいは C 末端のペプチド配列を付加した GFP、および内在性ペルオキシソームタンパクの局在を検証した結果、VCP はペルオキシソーム内腔タンパク、特に *catalase* の局在に関わることが明らかになった。また、ATPase 活性欠失変異体 VCP (K251A、K524A)の発現、或いは VCP の ATPase 活性阻害剤処理により、*catalase* のペルオキシソーム局在配列を付加した GFP (GFP-KANL)の局在変化が生じたことから、*catalase* のペルオキシソーム局在には VCP の ATPase 活性が必要であることが示された。

VCP の相互作用因子を探索するための免疫沈降および質量分析による解析から、VCP とペルオキシソームを関連付ける因子として、ペルオキシソーム膜タンパク輸送因子 PEX19 が得られた。PEX19 ノックダウン細胞では VCP ノックダウンと同様に、ペルオキシソーム内腔タンパクである *catalase* の局在変化が生じたことから、VCP は PEX19 と協調して *catalase* の局在に寄与している可能性が考えられた。

Catalase は ROS (reactive oxygen species)である H_2O_2 の分解を触媒する抗酸化酵素である。VCP ノックダウン細胞において、 H_2O_2 処理による細胞内 ROS の上昇が軽減されたことから、*catalase* の局在変化は、細胞にとって防御的な意義を持つことが想定された。VCP は酸化ストレス誘導時、システイン残基の酸化修

飾により ATPase 活性が低下することが当研究室において明らかにされている。酸化ストレス誘導剤の処理によって GFP-KANL および catalase の局在変化が生じたが、酸化修飾抵抗性変異体 VCP (C522T) を発現させた細胞ではその局在変化が低減されることが明らかになった。

以上の結果から、VCP の酸化修飾と catalase の局在変化を介した H_2O_2 レベル調節機構の存在が示唆される。VCP は種間で高度に保存されたタンパクであるが、522 番目のシステイン残基は出芽酵母では保存されていない。この知見に合致するように、出芽酵母ではペルオキシソーム局在型および細胞質局在型の 2 種類の catalase が存在している。これらの点から、VCP は高等動物が有するストレスフィードバック機構の一端を担う因子であることが推察される。

略語表

AAA:	ATPases associated with diverse cellular activities
ACAA1:	acetyl-CoA acyltransferase 1
ACOT8:	acyl-CoA thioesterase 8
ALS:	amyotrophic lateral sclerosis
ATP:	adenosine triphosphate
BSA:	bovine serum albumin
CDC:	cell division cycle
CHX:	cyclohexymide
DNA:	deoxyribonucleic acid
DAPI:	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate
DBeQ:	N2,N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine
ER:	endoplasmic reticulum
ERAD:	endoplasmic reticulum associated protein degradation
FBS:	fetal bovine serum
GFP:	green fluorescent protein
H ₂ DCFDA:	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HA:	hemagglutinin
HBSS:	hank's balanced salt solution
HRP:	horse radish peroxidase
IBMPFD:	inclusion body myopathy with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia
IgG:	immunoglobulin G
IRES:	internal ribosome entry site
LC-MS/MS:	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MJD:	Machado-Joseph disease
mPTS:	peroxisomal membrane-targeting signal
mRNA:	messenger ribonucleic acid
NLS:	nuclear localization signal
PBS:	phosphate-buffered saline
PEX:	peroxin
PMP:	peroxisomal membrane protein

PTE1: peroxisomal thioesterase 1
PTS1: peroxisome targeting signal 1
PTS2: peroxisome targeting signal 2
PDVF: polyvinylidene difluoride
RNA: ribonucleic acid
ROS: reactive oxygen species
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SOD: super oxide dismutase
TBST: tris-buffered saline / tween-20
VCP: valosin containing protein

序論

序論

VCP (valosin-containing protein)は AAA (ATPase associated with various cellular activities)ファミリーに属する ATPase である。D1 および D2 と呼ばれる特徴的な 2 つの ATPase ドメイン有し、ホモ 6 量体を形成して ATPase として機能することが知られている(Hanson & Whiteheart. 2005)。当初、ペプチドホルモン valosin の前駆体として分離されたことから、valosin-containing protein と命名されたが、valosin は精製過程の産物であったことが明らかとなっている(Koller & Brownstein. 1987)。VCP は種間で高度に保存されたタンパク質であり、マウス、ショウジョウバエはもとより、酵母、古細菌に至るまで VCP ホモログが見出されている(Ruden *et al.* 2000; Fröhlich *et al.* 1991; Pamnani *et al.* 1997)。

これまでの研究から、ヒトにおいて VCP と疾患との関わりが複数報告されている。神経変性疾患における VCP の機能解析が進められてきており、当研究室では、MJD タンパクの伸長したポリグルタミン領域に結合するタンパクとして VCP が同定された(Hirabayashi *et al.* 2001)。また、ポリグルタミンを始めとした細胞内の異常タンパクの凝集、分解に VCP が寄与することが明らかになっている(Kobayashi *et al.* 2002, 2007)。骨パジェット病と前側頭葉型痴呆を伴う遺伝性封入体筋炎 IBMPFD においては、VCP の変異およびその機能変化が発症の要因となることが報告されている(Watts *et al.* 2004; Manno *et al.* 2010)。また近年、筋萎縮性側索硬化症(ALS)においても VCP の関与が示唆されてきている(Johnson *et al.* 2010; Koppers *et al.* 2012; Tiloca *et al.* 2012; Williams *et al.* 2012)。一方、ヒトの種々のがん組織において VCP のタンパク量が増加していることが、当研究室において確認されている。同様の知見は他のグループからも複数報告されており、VCP の量とがんの悪性度、および患者の予後との相関が示されている(Yamamoto *et al.* 2003a, b, 2004a-e, 2005; Valle *et al.* 2011)。さらには、糖尿病関連因子に VCP が含まれることが報告されていることなどから(Lu *et al.* 2008)、VCP は疾患関連タンパクと位置付けることができる。

前述の疾患に関わる機能も含め、VCP は多くの細胞内イベントに関与することが明らかとなっており、細胞分裂や細胞死の調節などにも機能することが報告されている(Yamanaka *et al.* 2011)。また、VCP の有する主要な機能の 1 つに、オルガネラの形成、維持が挙げられる。ゴルジ体膜の再融合、核膜の再構成、小胞体関連タンパク分解(ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation)などの機能が知られる(Vembar & Brodsky 2008)。また近年、ミトコンドリア外膜

タンパクの分解に関与することが報告されている(Heo *et al.* 2010)。

オルガネラには、異なるオルガネラ間の相互作用や、形成、維持機構の類似性見られることが報告されている。ペルオキシソームは ER 由来のオルガネラであることが明らかにされており、ペルオキシソームと ER の間に見られる、タンパク分解の分子メカニズムの類似性が論じられている(Shiozawa *et al.* 2006; Titorenko & Mullen. 2006)。また、ER とミトコンドリア間での相互作用が報告されている(Kornmann *et al.* 2009)。

VCP を対象とした多くの研究が展開されてきているが、近年新たに、VCP がオートファジーによるタンパク分解にも関与することが明らかにされている(Wang *et al.* 2011)。これらの知見に加え、VCP と様々なタンパクとの相互作用が確認されていること(Dreveny *et al.* 2004)、多数の翻訳後修飾を受け得ることが報告されていることからその機能の多様性が予想され(Mori-Konya *et al.* 2009)、ER、ゴルジ体のみならず、他のオルガネラの形成、維持にも寄与する可能性が考えられる。

以上のような背景から、VCP のさらなる機能解析により、各種細胞内イベントの詳細な理解、さらには各種疾患の基礎的な知見に繋がることが期待される。

本研究では、VCP の未知の機能、特にオルガネラの形成、維持に関する役割を探索すると共に、その生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

本論第 1 章では、VCP のペルオキシソームタンパク輸送への関与について論じる。VCP の RNAi および各種オルガネラマーカー GFP 発現細胞株を用いた live cell イメージングによる解析を行い、VCP のペルオキシソームへの関与を見出した。また、内在性ペルオキシソームタンパクに対する VCP ノックダウンの影響について検討を行った。

第 2 章では、VCP の関わるペルオキシソームタンパク輸送メカニズムについて考察する。ATP 活性欠失変異体 VCP および VCP 阻害剤を用い、VCP の ATPase 活性に着目した検証を行った。また、ペルオキシソーム内腔タンパク輸送因子である PEX5 との関連性を評価した。

第 3 章では、VCP とペルオキシソーム形成因子 PEX19 との相互作用、および各ノックダウンフェノタイプの比較を行った。免疫沈降法を用いた相互作用解析により、VCP と PEX19 の相互作用を示す結果が得られた。また、PEX19 ノックダウンにより catalase の局在異常が生じることが明らかになり、VCP ノックダウンと同様のフェノタイプが得られることを見出した。

第4章では、酸化ストレス下における catalase 局在変化と VCP の関わりについて述べる。Catalase の局在に対する酸化ストレスの影響、および VCP の酸化修飾との関連について検討を行った。VCP の酸化修飾、catalase の局在変化を介した新規の酸化ストレス応答メカニズムについて考察する。

第一章

VCP のペルオキシソームタンパク輸送 機構への関与

1-1: 緒言

VCP の細胞内機能解析を行う際のアプローチの 1 つとして、RNAi によるノックダウン系が有用である。これまでの研究において、培養細胞を用いた VCP ノックダウン系での評価が行われており、タンパク分解、細胞周期への影響が生じることが報告されている (Wójcik *et al.* 2004)。オルガネラの形成、維持の観点では、*in vitro* 再構成系やセミインタクト細胞を用い、VCP が ER やゴルジ体の形成、維持に関わることが報告されている (Kondo *et al.* 1997; Kano *et al.* 2005; Uchiyama *et al.* 2002; 2006)。本章では、オルガネラ局在型 GFP 発現細胞株および RNAi による VCP ノックダウンを用い、各種オルガネラに対する VCP の関わりを確認した。

ペルオキシソームへのタンパク輸送は、内腔あるいは膜への輸送の 2 種類に大別される(Heiland & Erdmann. 2005)。内腔へのタンパク輸送は、C 末端側のシグナル配列である PTS1 (peroxisome targeting signal 1)あるいは N 末端側のシグナル配列である PTS2 (peroxisome targeting signal 2)の 2 種類が知られており、ペルオキシソーム膜へのタンパク輸送は、mPTS (peroxisomal membrane-targeting signal)によって調節される。配列の異なる複数のペルオキシソーム局在型 GFP を作製し、VCP ノックダウンによる影響を比較した。さらに、内在性のペルオキシソーム内腔タンパク、ペルオキシソーム膜タンパクの局在に対する VCP ノックダウンの影響を検証した。

1-2: 材料と方法

1-2-1 : 細胞株および細胞培養

HeLa 細胞および各種 GFP 安定発現株は 10%FBS を添加したダルベッコ変法イーグル培地[1.0g/l グルコース][L-グルタミン, ピルビン酸含有] (Nacalai Tesque)を用い、37°C の 5%CO₂ インキュベーターで培養を行った。培養、継代には基本的に 10cm 培養ディッシュ(FPI)および 0.05g/l-Trypsin/0.53mmol/l-EDTA Solution (Nacalai Tesque)を使用、凍結保存ストックの調製にはセルバンカー(十慈フィールド)を用いた。

1-2-2 : プラスミド、siRNA

GFP-SKL、GFP-Nuc、GFP-mito および GFP-ER の cDNA はそれぞれ pEGFP-peroxi、pEGFP-Nuc、pEGFP-mito、pEGFP-ER (Clontech)から取得した。GFP-KANL の cDNA は pEGFP-peroxi をテンプレートとし、PCR による変異導入を行って作製した。PTS2 シグナル配列の cDNA は、HeLa 細胞の total RNA から ACAA1 (acetyl-CoA acyltransferase 1)の PTS2 シグナル配列部分を RT-PCR によって増幅して取得した。得られた各オルガネラ局在型 GFP の cDNA を pIRES-puro に組み込み、安定発現株作製に使用した。

siRNA は以下の標的配列を用い、メーカーに合成を委託した。

VCP (nc): 5'-CGGGAGAGGCGCGCGCCAT-3' (IDT)

VCP (286): 5'-GGTTAATTGTTGATGAAGCCATCAA-3' (Invitrogen)

Control: 5'-CGGACGCGTCAGGAGCCGGTT-3' (IDT)

1-2-3 : トランスフェクション

プラスミドのトランスフェクションは Lipofectamine reagent および Plus reagent (共に invitrogen)を使用した下記のプロトコルに従った。35mm 培養ディッシュ 1 枚あたり 2×10^5 個の細胞を播種し、24 時間後に 2ml の Opti-MEM (GIBCO)に交換したうえトランスフェクションに使用した。DNA:1 μ g、Opti-MEM:100 μ l、Plus reagent:6 μ l の混合液、および Lipofectamine reagent:4 μ l、Opti-MEM:100 μ l の混合液をそれぞれ調整、15 分間静置後に混合し、さらに 15 分後、培養液中に添加した。37°C の 5% CO₂ インキュベーターで 3 時間静置した後、増殖培地に交換した。

siRNA のトランスフェクションは Oligofectamine (Invitrogen)を使用し、以下の手順に従って行った。35mm 培養ディッシュ 1 枚あたり 1.2×10^5 個の細胞を播種し、24 時間後にトランスフェクションに用いた。siRNA (20 μ M stock): 2.5 μ l、Opti-MEM: 360 μ l の混合液、および OligofectAmine: 4 μ l、Opti-MEM: 360 μ l の混合液をそれぞれ 5 分間インキュベーションした後、両者を混合した。20 分間インキュベーションした後に培養液中に添加し、翌日目的の実験系に合わせて継代、培養を行った。

1-2-4 : 安定発現株の作製

HeLa 細胞に pEGFP-SKL-IRES-puro を始めとするオルガネラ局在型 GFP 発現プラスミドをトランスフェクションによって導入し、24 時間後から 2.5 μ g/ml の puromycin を添加した。約 2 週間薬剤選択を行って薬剤耐性細胞を培養し、安定発現株を得た。

1-2-5 : 細胞分画

10cm 培養ディッシュでコンフルエントとなるよう目的の細胞を培養、PBS で 2 回洗浄した後、トリプシン/EDTA 処理によって細胞を回収した。細胞計数装置 (CDA-500, Sysmex) にて細胞数をカウントしてサンプル間の細胞数を揃え、サンプルを等分して分画用、whole cell lysate 用とした。whole cell lysate 用サンプルはプロテアーゼ阻害剤カクテルを添加した可溶化バッファー(62.5mM Tris-HCl pH6.8、 2% SDS、10% glycerol)を用いて可溶化、ソニケーターでサンプルの粘性を解消した後、Dc protein assay kit (Bio Rad)を用いてタンパク定量を行った。サンプル間のタンパク濃度を均一にした後、2- mercaptoethanol およびブロモフェノールブルーを添加、100°C にて 3 分間加熱処理を行い、SDS-PAGE およびウェスタンブロットに使用した。

分画用サンプルは Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) を用いて、細胞質、膜・オルガネラ、核の各画分を取得した。製品添付マニュアルに従って処理を行い、得られたサンプルは whole cell lysate 用サンプルのタンパク濃度を基準にサンプル間の量を補正、希釈調整した。5xSDS サンプルバッファー (312.5 mM Tris-HCl pH 6.8; 10% SDS; 50% glycerol; 5% 2-mercaptoethanol; 0.1 % bromophenol blue.) を添加し、100°C にて 3 分間加熱処理を行い、SDS-PAGE およびウェスタンブロットに使用した。

1-2-6 : SDS-PAGE およびウェスタンブロット

プロテアーゼ阻害剤を添加した可溶化バッファー(62.5mM Tris-HCl pH6.8、 2% SDS、10% glycerol)を用いて目的の細胞を可溶化、ソニケーターでサンプルの粘性を解消した後、Dc protein assay kit (Bio Rad)を用いてタンパク定量を行った。サンプル間のタンパク濃度を均一にした後、5% 2-mercaptoethanol および

0.001% bromophenol blue を添加、100°C にて 3min 加熱処理を行い、SDS-PAGE にてポリアクリルアミドゲルに展開した。タンパクを PVDF 膜に転写した後、5% スキムミルクを含む TBST に浸して室温 1 時間振とうした。続いて、5% スキムミルクを含む TBST にて希釈した 1 次抗体溶液中で室温 1 時間もしくは 4°C 一晩振とうし、TBST にて 10 分間 x 3 回洗浄した。TBST にて希釈した 2 次抗体溶液中で室温 1 時間振とうし、TBST にて 10 分間 x 3 回洗浄した。2 次抗体は Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey もしくは Anti-mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (GE Healthcare)を使用した。TBST 洗浄後、PDVF 膜の水分をペーパータオルで吸収し、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)を添加、イメージアナライザーLAS-1000 (Fuji film)にてシグナルを検出した。

1-2-7 : Live cell イメージング

35mm 培養ディッシュで目的の細胞の培養を行い、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss)にて 40 倍の水浸対物レンズを用いて観察、画像取得を行った。

1-2-8 : 抗体

以下の抗体を各メーカーから購入し、ウェスタンブロットおよび細胞染色に使用した。anti-actin (chemicon)、anti-catalase (Calbiochem)、anti-ACOT8 (santa cruz)、anti-PMP70 (Zymed)、anti-mouse IgG Alexa 488 conjugated (Molecular probes)、anti-rabbit IgG Alexa 488 conjugated (Molecular probes)。抗 VCP 抗体(ウサギ血清)は当研究室にて作製されたものを用いた(Hirabayashi *et al.* 2001)。

1-2-9 : 細胞染色

コラーゲン type I コートを行った 12mm 径カバーガラス上に目的の細胞を培養、3.7%ホルマリンを含む PBS で室温 10 分間固定を行った。0.5%の Triton X-100 を含む PBS で室温 10 分間処理した後、ブロッキングバッファー(0.1%の BSA および 0.1%のスキムミルクを含む PBS)で室温 1 時間処理した。パラフィルムを敷いた湿潤容器内にカバーガラスを移し、ブロッキングバッファーにて希釈した 1

次抗体溶液を、100 μ l/glass にて添加、室温 1 時間静置した。350 μ l/glass の PBS にて 2 回洗浄を行った後、1:1000 でブロッキングバッファーにて希釈した 2 次抗体溶液を 100 μ l/glass にて添加、室温 1 時間静置した。350 μ l/glass の PBS にて 3 回洗浄を行った後、DAPI を含むマウンティングメディウム(Vectashield; Vector Laboratories)を用いてプレパラートを作製した。PMP70 を検出する際は、ホルマリン固定後の膜透過処理を 0.5% triton X-100 の代わりに、25 μ g/ml のジギトニンを含む PBS の 5 分間処理とした。

1 次抗体の希釈は、それぞれ anti-catalase (1:2500)、anti-ACOT8 (1:50)、anti-PMP70 (1:400)で行った。

作製したプレパラートは共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss)にて 40 倍の位相差対物レンズを用いて観察、画像取得を行った。

1-3: 結果

<結果の概要>

各種オルガネラ局在型 GFP 発現細胞を用いて VCP ノックダウンを行った結果、C 末端に-Ser-Lys-Leu を付加したペルオキシソーム局在型 GFP が VCP のノックダウンに伴い細胞質に局在する傾向が確認された。ペルオキシソームへのタンパク局在と VCP の関わりに着目し、さらに他のペルオキシソーム局在配列を付加した GFP、内在性のペルオキシソームタンパクの挙動を確認したところ、C 末端に-Lys-Ala-Asn-Leu を持つペルオキシソーム内腔タンパク catalase の局在が VCP ノックダウンに伴い変化することが分かった。

1-3-1 : オルガネラ局在型 GFP 発現株における VCP ノックダウンの影響

ミトコンドリア、核、小胞体、ペルオキシソームへの局在配列をそれぞれ付加した GFP 遺伝子を構築、安定発現株の作製を容易にするため、オルガネラ局在型 GFP と同一の mRNA 内で puromycin 耐性遺伝子を発現可能なベクターを作成した(図 1-a)。これらの GFP を HeLa 細胞に恒常的に発現させた安定発現株を作製、各シグナル配列の性質に一致した GFP の局在パターンを示す HeLa 細胞株が得られた(図 1-b)。

作製した HeLa 細胞株を用い、siRNA による VCP ノックダウンを行った。ミトコンドリア、核、小胞体への GFP 局在は、VCP ノックダウンに伴う顕著な変化は確認されなかった(図 2)。一方、ペルオキシソーム局在型 GFP が、VCP ノックダウンに伴い細胞質にも局在する傾向が得られた(図 2)。

1-3-2：ペルオキシソーム局在型 GFP 発現株における VCP ノックダウンの影響

ペルオキシソーム内腔へのタンパク輸送には、C 末端側の非切断型シグナル配列である PTS1 配列-(S/A/C)-(K/R/H)-(L/M)、N 末端側の切断型シグナル配列である PTS2 配列(R/K)-(L/I/V)-X₅-(Q/H)-(L/I/V)- がペルオキシソーム局在シグナルとして機能することが知られている(Wanders & Waterham 2006)。これらのシグナル配列を付加した GFP の局在に対する VCP ノックダウンの影響を確認するため、前項と同様に発現ベクターを構築した(図 3-a)。HeLa 細胞を用い、図 3-a に記載の GFP の安定発現株を作製した結果、GFP-SKL と同様にドット上の局在が確認された(図 3-b)。

これらのペルオキシソーム局在型 GFP 安定発現株を用いて VCP ノックダウンを行った結果、GFP-KANL において顕著な局在異常が確認された(図 4-a, -c)。一方、PTS2-GFP 安定発現株においては、VCP ノックダウンに伴う GFP の局在変化は確認されなかった(図 4 -b)。

1-3-3：内在性ペルオキシソームタンパクに対する VCP ノックダウンの影響

前項において、PTS1 配列を持つ GFP、特に-KANL 配列において VCP ノックダウンに伴う局在異常が確認された。内在性のペルオキシソーム内腔タンパクで同様の検証を行うため、-SKL 配列を持つ PTE1 (peroxisomal thioesterase 1)および-KANL 配列を持つ catalase の局在に対する VCP ノックダウンの影響を確認した。VCP ノックダウン時、PTE1 の局在に目立った変化は見られなかったが、catalase は GFP-KANL と同様、VCP ノックダウンに伴い細胞質への局在が増加する結果が得られた(図 5 -a、-b)。一方、内在性のペルオキシソーム膜タンパクである PMP70 は、VCP ノックダウンに伴う局在異常を示さなかった(図 5 -c)。

1-4: 考察 (小括 1)

1-4-1: オルガネラ局在型 GFP 発現株における VCP ノックダウンの影響

VCP ノックダウンに伴い、ペルオキシソーム局在型 GFP の細胞質への局在が認められたことから、VCP がペルオキシソームタンパク輸送に関与していると考えられる。ペルオキシソームタンパクの局在に対する VCP の関与は過去に報告されておらず、ペルオキシソームタンパクの局在と VCP との関わりに焦点を当て、以降の検証を進めた。過去の研究において、VCP が ER の再構成に関わることが報告されているが(Kano *et al.* 2005; Uchiyama *et al.* 2006)、今回行ったアプローチにおいては、VCP ノックダウンに伴う核や小胞体の変化は確認されていない。評価系の違いに加え、GFP の局在パターンが顕著に変化する程のオルガネラの構造変化が生じていないものと考えられる。

1-4-2: ペルオキシソーム局在型 GFP 発現株における VCP ノックダウンの影響

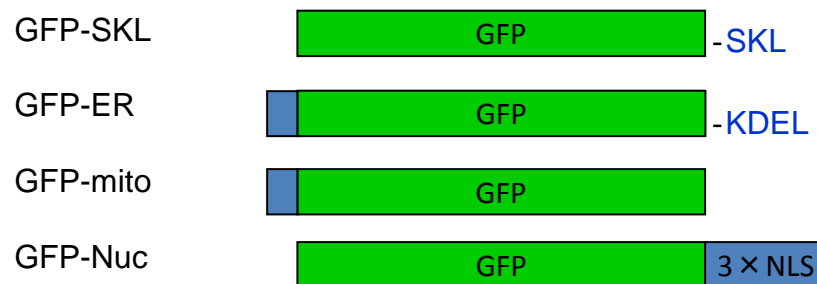
PTS1 タンパクのペルオキシソーム内への輸送には、細胞質中で PTS1 シグナルを認識する輸送因子 PEX5 を介することが知られている(Heiland & Erdmann. 2005)。一方、PTS2 タンパクの輸送には、別のペルオキシソームタンパク輸送因子 PEX7 が類似の働きを担うことが報告されている。今回の結果から、VCP は PEX5 を介した PTS1 タンパクの輸送に関わることが推察される。

1-4-3: 内在性ペルオキシソームタンパクに対する VCP ノックダウンの影響

GFP を用いた系では-SKL 配列において VCP ノックダウンの影響が見られたものの、-SKL 配列を持つ内在性のペルオキシソームタンパク PTE1 では同様の傾向が得られなかった。従って、VCP はペルオキシソームタンパクの中でも特に-KANL 配列を持つ catalase の局在に寄与するものと考えられる。PTS1 シグナル配列は様々なバリエーションが存在するが、-KANL 配列は catalase に固有のものである(Purdue & Lazarow. 1996)。-KANL 配列は、多くの PTS1 タンパクが持つ-SKL 配列に比べ、PEX5 との親和性が低く、ペルオキシソームへの局在性が弱いことが報告されている(Maynard *et al.* 2004)。VCP は分子シャペロンとしての機能を有することが報告されているが(Kobayashi *et al.* 2007)、PTS1 タンパク

の局在に DnaJ、Hsc70 といったシャペロンタンパクが関与するという報告がある (Crookes & Olsen. 1998; Harano *et al.* 2001; Hettema *et al.* 1998)。これらの知見から、VCP は catalase と PEX5 の親和性を保つための役割を有している可能性が考えられる。

a



b

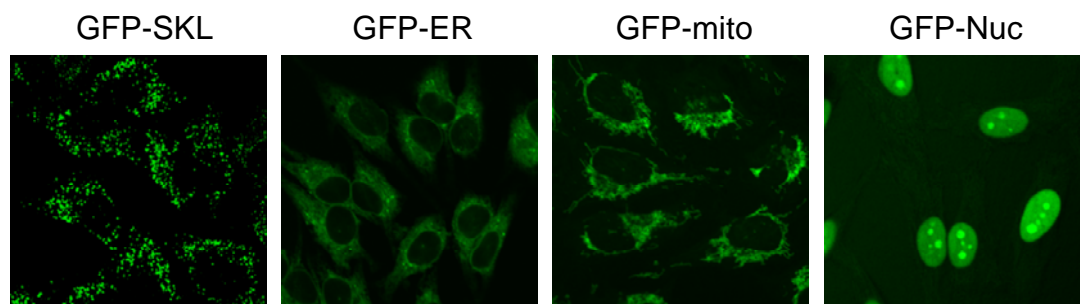


図 1: 各種オルガネラ局在型 GFP の構造と細胞内局在

a) オルガネラ局在型 GFP の配列模式図。それぞれ、GFP (緑色部分)および局在シグナル(水色部分および青字のアミノ酸配列)を示す。

b) a)に示すオルガネラ局在型 GFP の安定発現 HeLa 細胞株の GFP 像。共焦点レーザー顕微鏡を用い、生細胞の状態で撮像を行った。

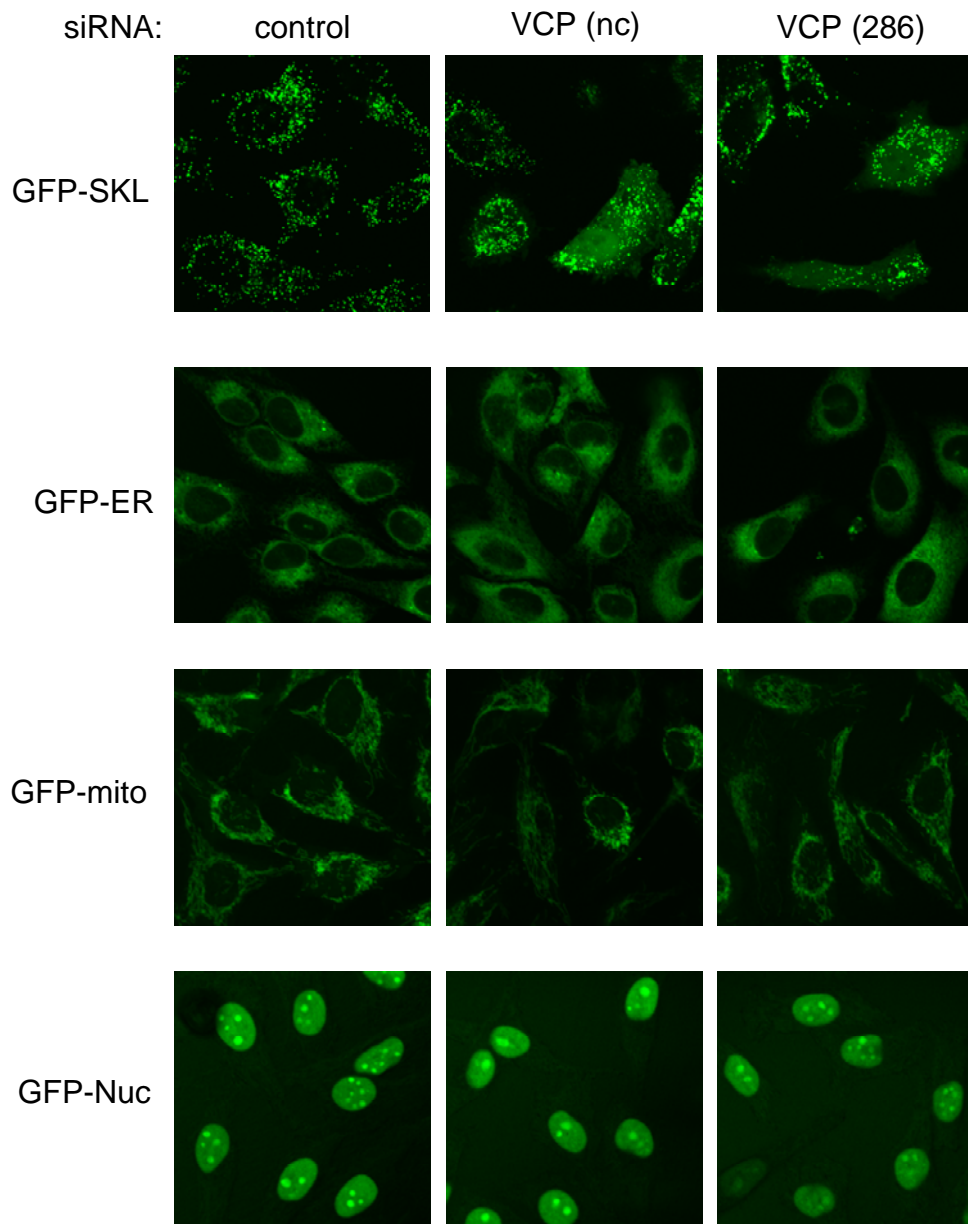
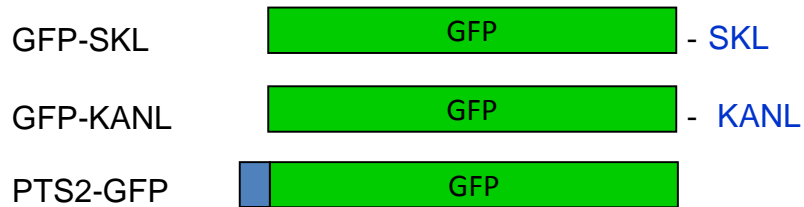


図 2: オルガネラ局在型 GFP 発現株における VCP ノックダウンの影響

オルガネラ局在型 GFP 安定発現 HeLa 細胞株を用い、VCP siRNA (nc: non-coding、286)もしくは control siRNA をトランスフェクション、72 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて生細胞状態の GFP 局在を確認した。

a



b

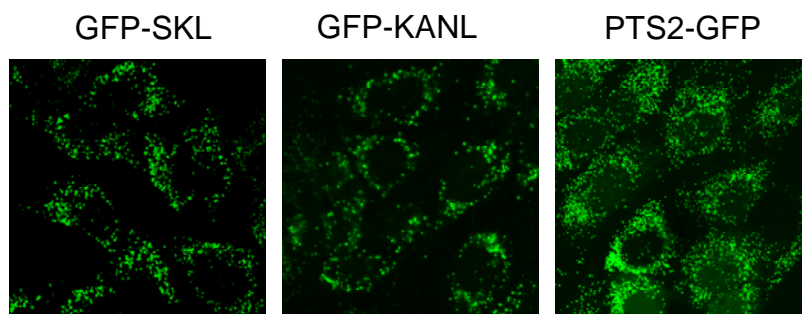


図 3: ペルオキシソーム局在型 GFP 発現株の構造と細胞内局在

a) ペルオキシソーム局在型 GFP の配列模式図。それぞれ、GFP (緑色部分)および局在シグナル(水色部分および青字のアミノ酸配列)を示す。

b) a)に示すペルオキシソーム局在型 GFP の安定発現 HeLa 細胞株の GFP 像。共焦点レーザー顕微鏡を用い、生細胞の状態で撮像を行った。

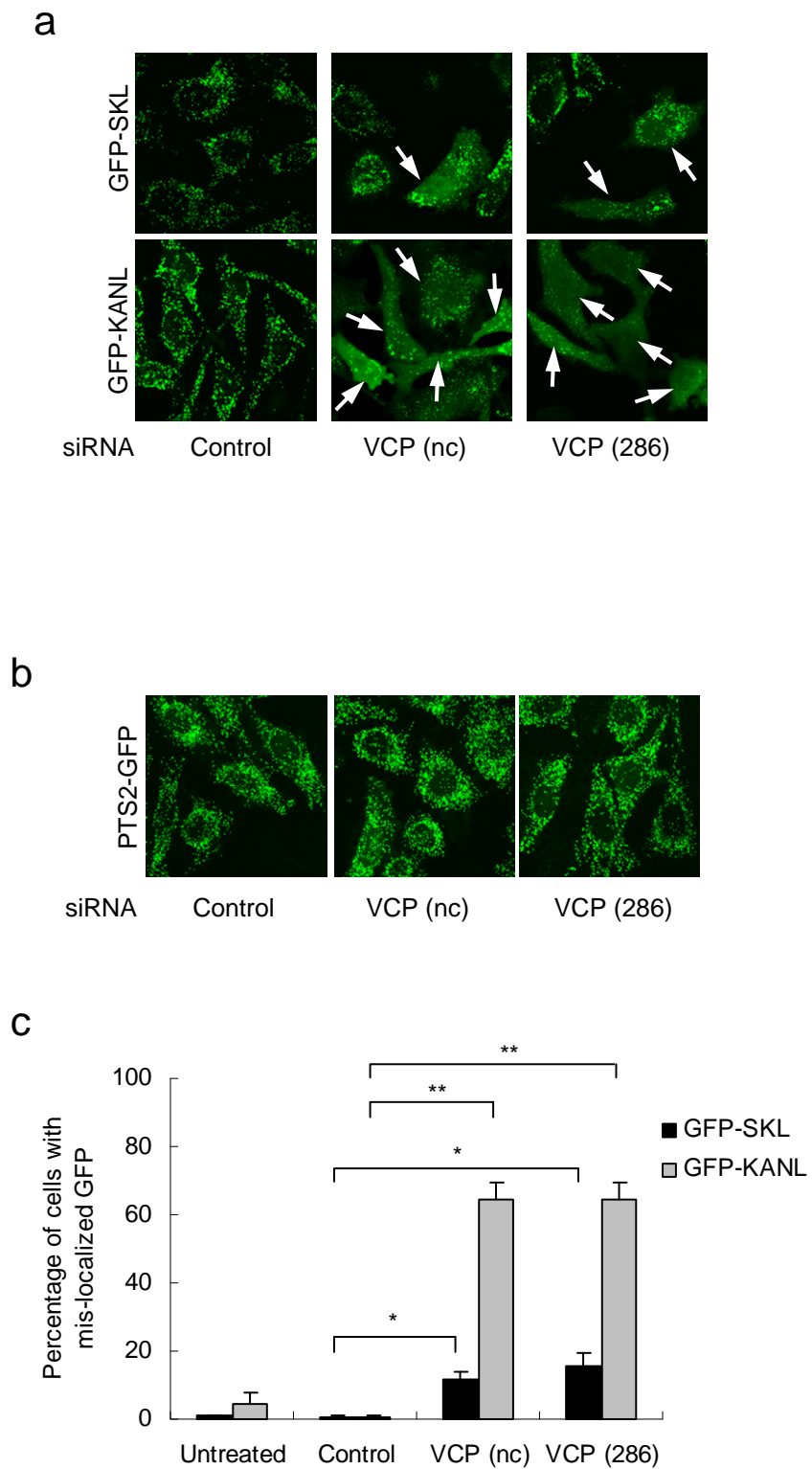


図 4: ペルオキシソーム局在型 **GFP** 発現株における **VCP** ノックダウンの影響
a) PTS1 型ペルオキシソーム局在 **GFP** 安定発現 HeLa 細胞株を用い、VCP siRNA

(nc: non-coding、および 286)もしくは control siRNA をトランスフェクション、72 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて生細胞状態の GFP 局在を確認した。矢印は細胞質に GFP が局在する細胞を示す。

b) PTS2 型ペルオキシソーム局在 GFP 安定発現 HeLa 細胞株を用い、VCP siRNA(nc: non-coding、および 286)もしくは control siRNA をトランスフェクション、72 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて生細胞状態の GFP 局在を確認した。

c) a)に示す GFP-SKL および GFP-KANL 安定発現 HeLa 細胞株における GFP の細胞内局在状態の評価。局在異常を示した細胞の比率について、各サンプル 200 細胞以上をカウントした $n=3$ の平均値を示す。Student's t-test による有意差検定を行った。(エラーバー : S.D 、 ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

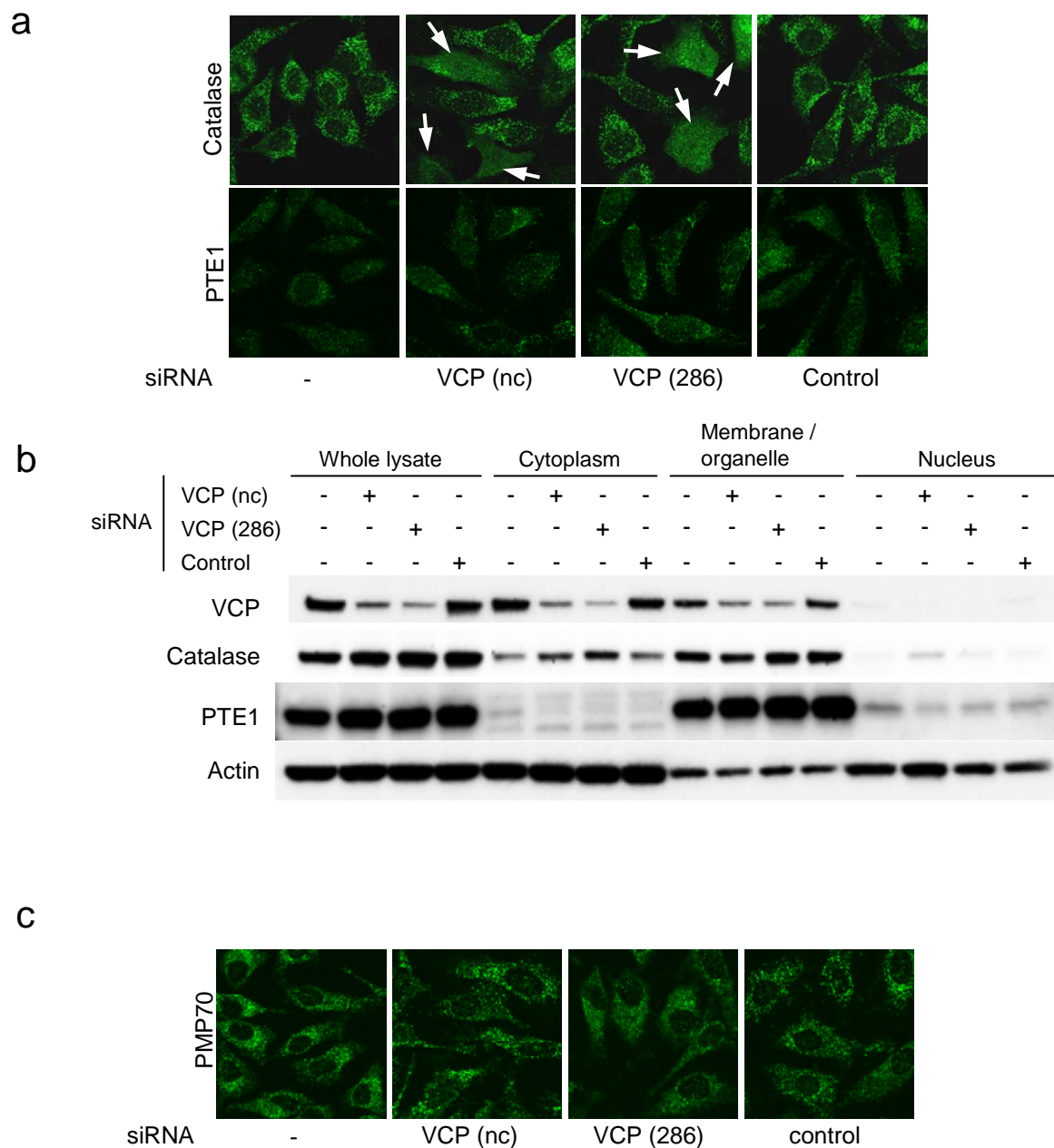


図 5 内在性ペルオキシソームタンパクに対する VCP ノックダウンの影響

a) HeLa 細胞における catalase および PTE1 の細胞内局在。HeLa 細胞を用い、VCP siRNA (nc: non-coding、および 286)もしくは control siRNA をトランスフェクシ

ョン、72 時間後に固定、抗 catalase 抗体および抗 ACOT8 (PTE1)抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。矢印は細胞質に catalase の局在が見られる細胞を示す。

b) a)におけるウェスタンブロット。HeLa 細胞に VCP siRNA (nc: non-coding、および 286)もしくは control siRNA をトランスフェクション、72 時間後に細胞分画を行い、細胞質、膜/およびオルガネラ、核成分に分離した。whole cell lysate (7.5 μ g/well) および whole cell lysate 7.5 μ g 分に相当する各分画サンプルを SDS-PAGE でポリアクリルアミドゲルに展開、各タンパクに特異的な抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

c) HeLa 細胞における PMP70 の細胞内局在。HeLa 細胞株を用い、VCP siRNA (nc: non-coding、および 286)もしくは control siRNA をトランスフェクション、72 時間後に固定、抗 PMP70 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

第二章

VCP の関わるペルオキシソームタンパク 輸送メカニズムの解析

2-1: 緒言

第1章において、VCPがペルオキシソームタンパク、特にC末端に-KANL配列を持つ catalase の局在に関与することが明らかになった。VCPはAAAファミリーに属するATPaseであり、そのATP分解活性によって、様々な細胞内イベントに関わる。本章では、VCPのATPase変異体活性欠失変異体およびVCPのATPase活性阻害剤を用い、ペルオキシソームタンパクの局在とVCPのATPase活性の関わりについて検証した。また、VCPノックダウンに伴う catalase の局在変化が、ペルオキシソームへの輸送異常であるか、あるいは一度局在した catalase が再度細胞質に局在しているか検証を行った。さらに、ペルオキシソーム内腔タンパク輸送因子である PEX5 と VCP のノックダウンおよび過剰発現の組み合わせにより、各々の機能の相補性を確認した。

2-2: 材料と方法

2-2-1: プラスミド、siRNA およびトランスフェクション

PEX5 および catalase の cDNA は HeLa 細胞の total RNA から RT-PCR によって増幅した。プライマーは Sigma Aldrich に合成を委託、以下の配列を使用した。

PEX5 Forward Primer: 5'-CCATGGCAATGCGGGAGCT-3' PEX5 Reverse Primer:

5'-CCTCCAGGTCGACACTCAC-3' catalase Forward Primer:

5'-ACAGCAAACCGCACGCTAT-3' catalase Reverse Primer:

5'-ACGCTAAGCTTCGCTGCAC-3' catalase cDNA を pEGFP-C1 に組み込んだ後、

GFP-catalase 断片を pIRES-puro に組み込み、pEGFP-catalase-IRES puro を作製した。

PEX5 cDNA は pmCherry-C1 に組み込み、pmCherry-PEX5 を作製した。siRNA

は以下の配列を用い、Stealth RNAi siRNA (Invitrogen)にて合成を委託した。PEX5

(192): 5'-CAAGCCTTTGGGAGTAGCTTCTGAA-3' PEX5 (955):

5'-GACCTTACGTCAGCTACCTATGATA-3' プラスミドおよびsiRNAのトランス

フェクションは1-2-3に記載の方法に従って実施した。

2-2-2: 安定発現株の作製

HEK293A 細胞に pEGFP-catalase-IRES puro をトランスフェクションにて導入

し、24 時間後から 2.5 μ g/ml の puromycin で薬剤選択を行った。約 2 週間後に形成されたコロニーを単離して培養を継続し、GFP-catalase 安定発現株を得た。

その他の材料、方法については第一章に記載の内容と同様。

2-3: 結果

<結果の概要>

VCP の ATPase 活性欠失変異体の発現、あるいは VCP 阻害剤の処理によって、GFP-KANL や GFP-catalase の細胞質への局在が確認された。また、タンパク合成阻害剤である CHX (cyclohexymide) 処理によって、VCP ノックダウンに伴う GFP-KANL、あるいは内在性 catalase の細胞質への局在が軽減された。VCP および PEX5 のノックダウンで生じる GFP-KANL の局在異常は、ノックダウンした遺伝子の add-back により回復したが、VCP ノックダウンによる変化は PEX5 の過剰発現では回復しなかった。同様に、PEX5 ノックダウンによる変化は VCP の過剰発現で回復が見られず、ペルオキシソームへのタンパク輸送機構において VCP と PEX5 は相補的な関係にないことが明らかになった。

2-3-1 : VCP の ATPase 活性阻害による GFP-KANL、catalase 局在への影響

VCP の ATPase 活性欠失変異体として、2 つの ATPase ドメイン D1 および D2 にいずれかに変異を持つ VCP (K251A) および VCP (K524A) を用いた。これらの変異体では、VCP の ATPase 活性が見られないことが確認されている (Kobayashi *et al.* 2002)。C 末端側に赤色蛍光タンパク mCherry を付加した野生型 VCP および変異体 VCP を GFP-KANL 安定発現 HEK293A 細胞に発現させたところ、VCP (K251A)、VCP (K524A) のいずれも GFP-KANL の局在異常が生じた (図 6-a、-b)。さらに、GFP-catalase を安定発現させた HEK293A 細胞において、VCP の ATPase 阻害剤である DBE (N2,N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine) (Chou *et al.* 2011) の処理によって catalase の局在異常が確認された (図 6-c)。

2-3-2 : CHX 処理による GFP-KANL および catalase 局在異常の軽減

CHX は真核生物のリボソームにおける mRNA の翻訳に干渉し、タンパクの新規合成を阻害する。GFP-KANL 安定発現 HeLa 細胞において、VCP ノックダウンと共に CHX を添加したところ、GFP-KANL の局在異常を示す細胞が減少した (図 7 -a 、 -b)。同様に、内在性の catalase においても CHX の添加により局在異常が軽減された (図 7 -c 、 -d)。

2-3-3 : GFP-KANL 局在異常に対する PEX5 過剰発現の効果

PEX5 は PTS1 タンパクがペルオキシソーム内腔へ局在するために必要な輸送因子である。VCP ノックダウン時、同じ PTS1 タイプのペルオキシソーム局在シグナルを有するタンパクであっても、-KANL 配列を持つ catalase のみに局在異常が確認されたが(図 5-a、-b)、PEX5 ノックダウンでは過去の知見に一致して、PTE1、catalase いずれも局在異常を生じた(図 8-a)。GFP-KANL 安定発現 HeLa 細胞を用い、VCP および PEX5 のノックダウンと過剰発現を組み合わせ検証を行った結果、それぞれ同一の遺伝子の add-back により、GFP-KANL の局在異常が回復した。一方、VCP ノックダウンによる GFP-KANL の局在異常は、PEX5 の過剰発現で改善されなかった(図 8-b、-c)。また同様に、PEX5 ノックダウンによる GFP-KANL の局在異常は、VCP の過剰発現で改善されなかった(図 8-b、-c)。

2-4: 考察 (小括 2)

2-4-1 : VCP の ATPase 活性阻害による GFP-KANL、catalase 局在への影響

ATPase 活性を持たない VCP 変異体の発現、あるいは VCP の ATPase 阻害剤の処理によって GFP-KANL の局在異常が生じたことから、VCP はペルオキシソームタンパク輸送機構において単なる足場のような役割ではなく、ATPase 活性を利用して-KANL シグナル配列を持つタンパクの局在に寄与していると考えられる。VCP を含め、AAA ATPase ファミリーに分類されるタンパクは、膜融合、転写調節、DNA 複製、タンパク質の細胞内小器官への輸送、細胞内小器官の形成などに寄与することが知られている。ペルオキシソームタンパク輸送への VCP の関与も、ATPase としての VCP の機能の一旦であると理解できる。

2-4-2 : CHX 処理による GFP-KANL および catalase 局在異常の軽減

一般的にペルオキシソームタンパクの局在異常が見られた場合、ペルオキシソーム内へのタンパク輸送機構の異常と考えると理解しやすい。しかし、ペルオキシソームタンパク輸送因子である PEX5 は、PTS1 シグナルを持つタンパクと共にペルオキシソーム内に入った後、再度細胞質に局在を変化させることが報告されており (Dammai and Subramani 2001)、一度ペルオキシソーム内に局在した catalase が再度細胞質中にリリースされている可能性も残されていた。新規タンパク合成の阻害により、VCP ノックダウンによって生じる GFP-KANL および catalase の局在異常が軽減されたことから、ペルオキシソームへの輸送に異常が生じていると考えられる。

2-4-3 : GFP-KANL 局在異常に対する PEX5 過剰発現の効果

VCP の add-back により GFP-KANL の局在異常が VCP 回復したこと、ノックダウンで見られる GFP-KANL の局在異常が PEX5 過剰発現で改善されなかったことから、GFP-KANL の局在異常は PEX5 の異常を介した間接的なものではないと考えられる。また、PEX5 で見られる GFP-KANL の局在異常が VCP 過剰発現で改善されなかったことを合わせると、catalase の正常な局在には PEX5、VCP のいずれも必要であることが推察される。

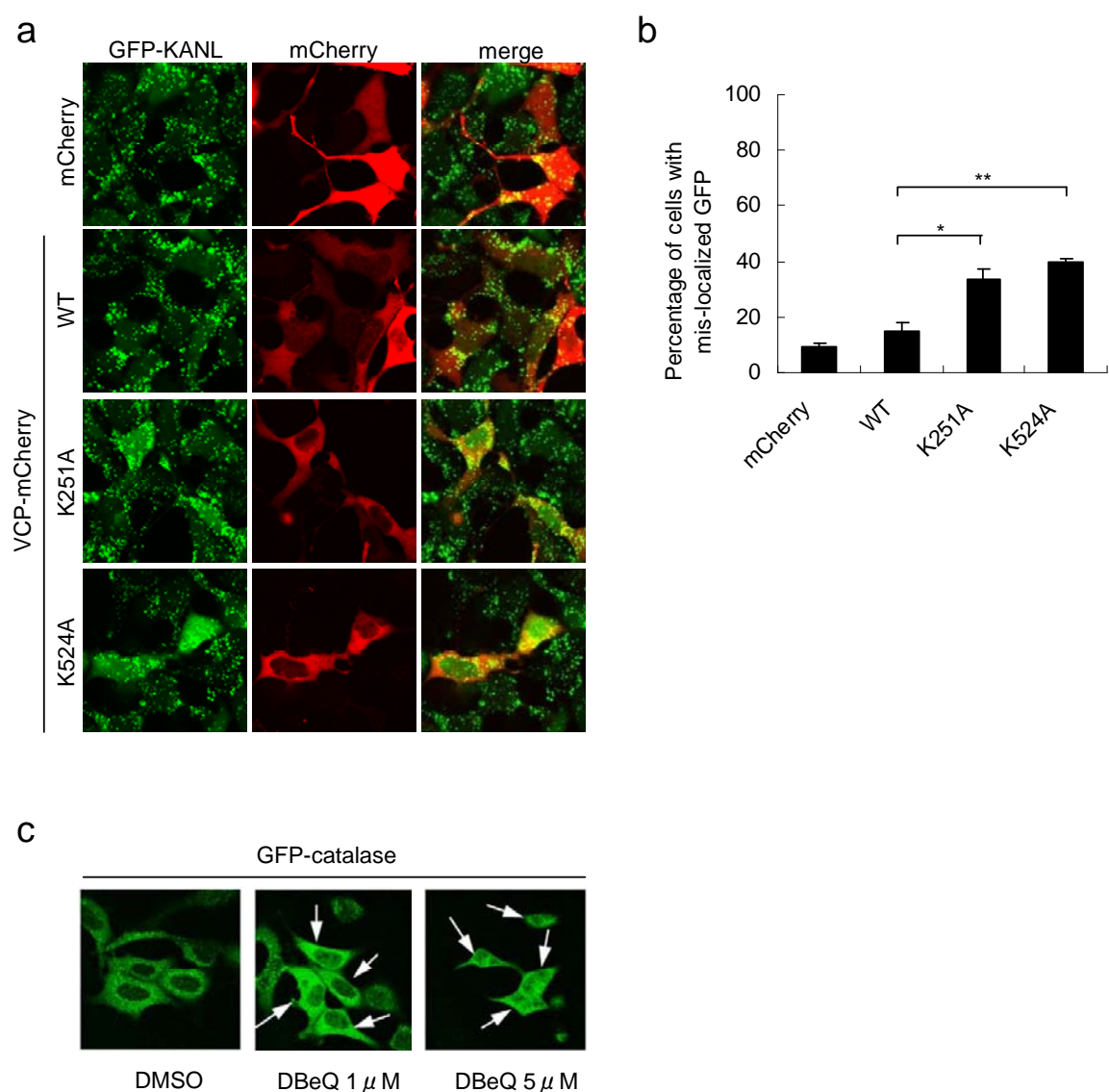


図 6 VCP の ATPase 活性阻害による GFP-KANL、catalase 局在への影響

a) VCP 変異体発現時の GFP-KANL の細胞内局在。GFP-KANL 安定発現 HEK293A 細胞株に、mCherry を付加した野生型 VCP もしくは ATPase 活性欠失変異体 VCP を発現させ、48 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて生細胞状態の GFP 局在を確認した。

b) a)に示す GFP-KANL 安定発現 HEK293A 細胞株における GFP の細胞内局在状態の評価。局在異常を示した細胞の比率について、各サンプル 200 細胞以上をカウントした n=3 の平均値を示す。Student's t-test による有意差検定を行った。(エ

ラーバー : S.D 、 ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

c) VCP 阻害剤による GFP-catalase の局在変化。GFP-catalase 安定発現 HEK293A 細胞に VCP の ATPase 阻害剤である DBeQ (1 μ M、5 μ M) もしくは DMSO を 24 時間処理、蛍光顕微鏡で GFP-catalase の細胞内局在を観察した。矢印は GFP-catalase の細胞質への局在を伴う細胞を示す。

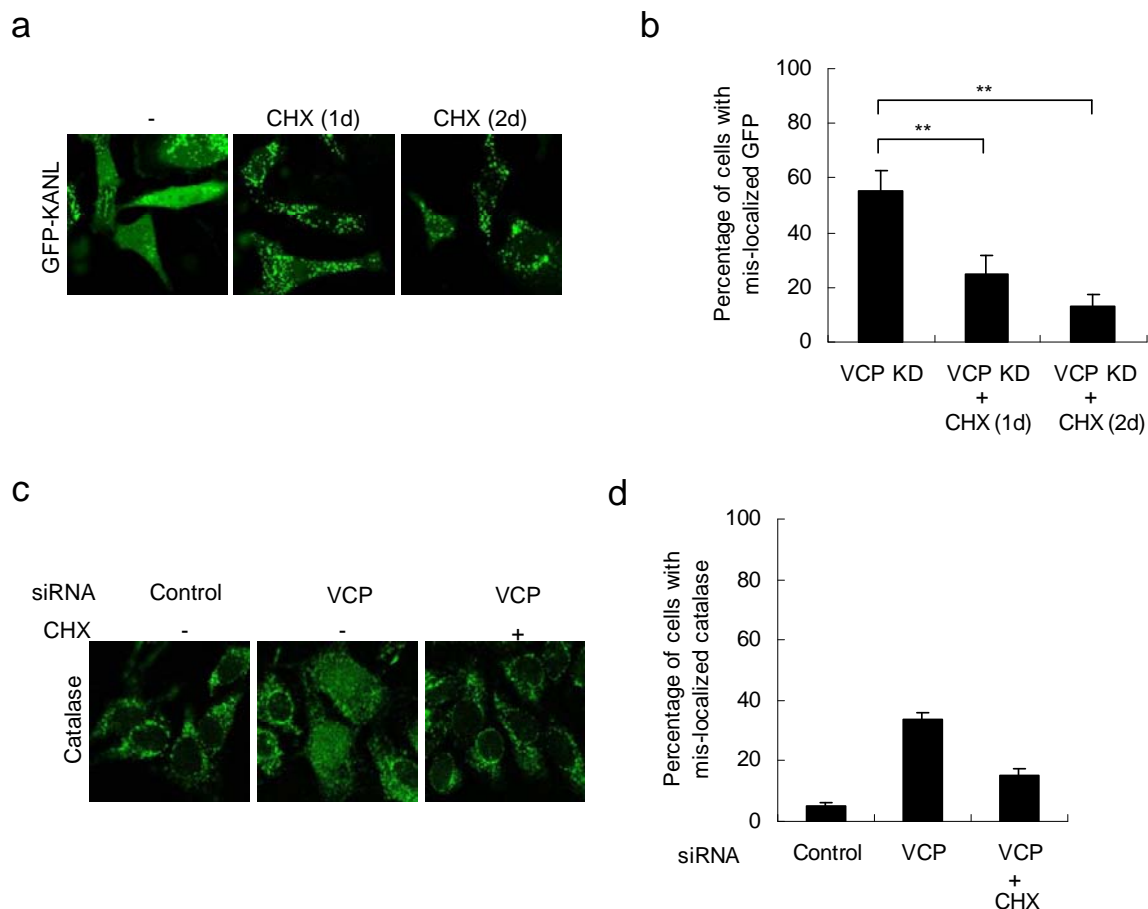


図7 シクロヘキシミド処理による **GFP-KANL** および **catalase** 局在異常の軽減

a) GFP-KANL の細胞内局在。GFP-KANL 安定発現 HeLa 細胞株を用い、VCP siRNA (286)を導入、72 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて生細胞状態の GFP 局在を確認した。siRNA 導入 24 時間後から 72 時間後まで、あるいは 48 時間後から 72 時間後まで 5 μ g/ml の CHX を含む培地で培養した。

b) a)に示す GFP- KANL 安定発現 HeLa 細胞株における GFP の細胞内局在状態の評価。各条件 200 細胞以上をカウントした n=3 の平均値を示す。(エラーバー : S.D 、 ** p < 0.01)

c) Catalase の細胞内局在。HeLa 細胞を用い、VCP siRNA (286)を導入、72 時間後に固定、免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて catalase の細胞内局在を確認した。siRNA 導入 24 時間後から 72 時間後まで、あるいは 48 時間後から 72 時間後まで 5 μ g/ml の CHX を含む培地で培養した。

d) c)に示す HeLa 細胞における catalase の細胞内局在状態の評価。各条件 200 細胞以上をカウントした n=3 の平均値を示す。(エラーバー : S.D)

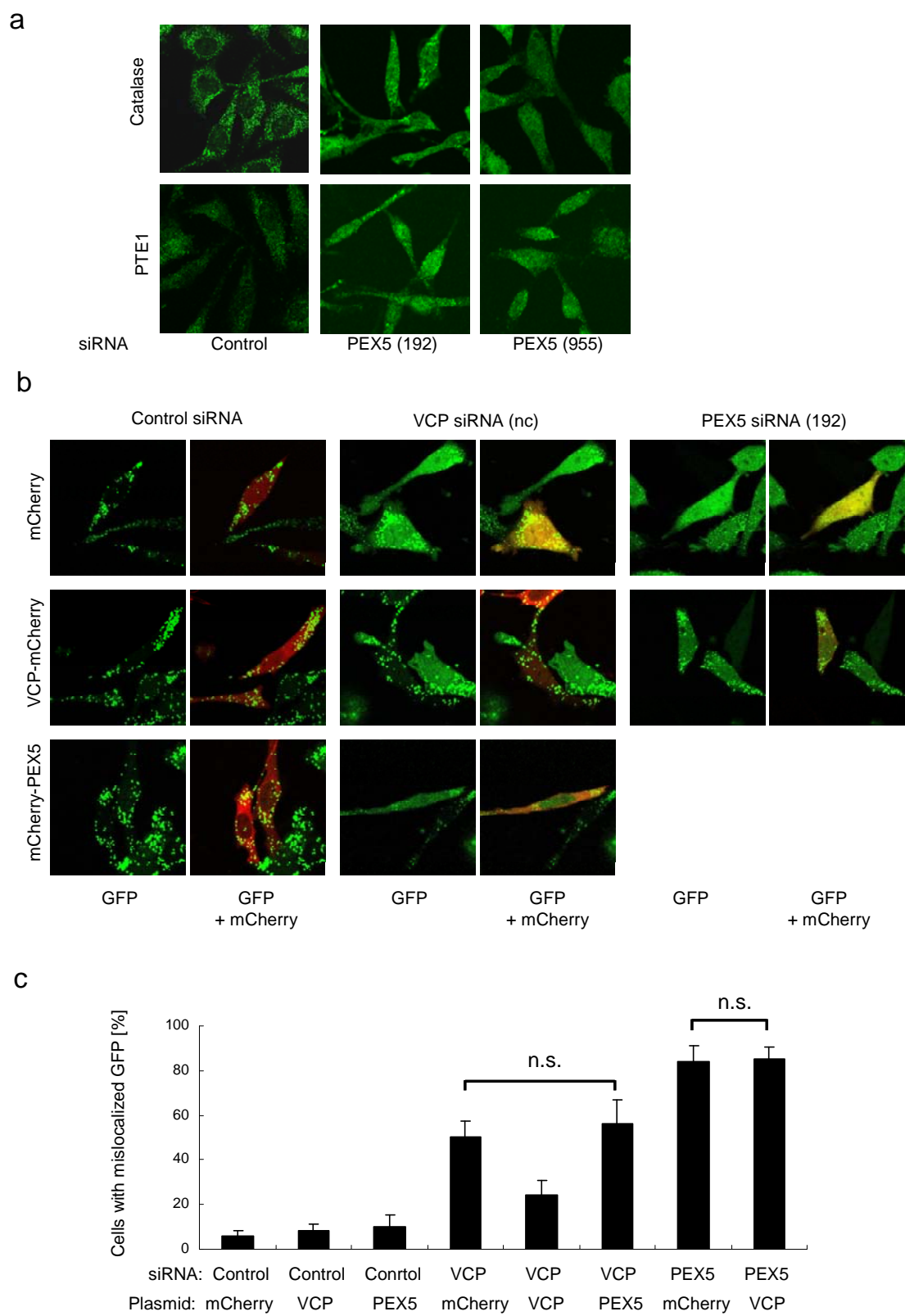


図 8 GFP-KANL 局在異常に対する PEX5 過剰発現の効果

- a) PEX5 ノックダウン時の PTE1、catalase の細胞内局在。HeLa 細胞に PEX5 siRNA (192 あるいは 955)、あるいは control siRNA をトランスフェクション、72 時間後に固定および免疫染色を行った。抗 catalase 抗体および抗 ACOT8 (PTE1)抗体を用い、catalase および PTE1 の局在を共焦点レーザー顕微鏡によって確認した。
- b) PEX5 および VCP ノックダウンと過剰発現の組み合わせによる add-back 実験。GFP-KANL 安定発現 HeLa 細胞株に VCP siRNA (nc)あるいは PEX5 siRNA (192) をトランスフェクションした。48 時間後、VCP-mCherry あるいは mCherry-PEX5 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に GFP および mCherry の蛍光像を共焦点レーザー顕微鏡で確認した。
- c) b)に示す PEX5 および VCP ノックダウンと過剰発現の組み合わせによる add-back 実験の GFP-KANL 局在状態の評価。各条件 120 細胞以上の mCherry 陽性細胞をカウント、細胞質に GFP-KANL が局在している細胞の割合を算出した n=3 の平均値を示す。Student's t-test による有意差検定を行った。(エラーバー : S.D 、 n.s.: not significant)

第三章

VCP と PEX19 の相互作用および
各ノックダウンフェノタイプの解析

3-1: 緒言

現在までに、VCP の相互作用因子として様々なタンパクが報告されてきているが(Dreveny *et al.* 2004)、ペルオキシソームとの関連を示す因子は含まれていなかった。当研究室において独自に同定された翻訳後修飾を模倣した変異体 VCP の相互作用因子を探索した検証において、ペルオキシソーム膜タンパク輸送因子である PEX19 が同定された。本章では、免疫沈降による VCP と PEX19 の相互作用の確認と、VCP および PEX19 ノックダウン時の catalase の局在の確認を行い、両者の関連性を検証した。

3-2: 材料と方法

3-2-1 プラスミド、siRNA

PEX19 cDNA を HeLa 細胞の total RNA から RT-PCR により増幅、pCMV-HA プラスミドに組み込んだ。プライマーは Sigma Aldrich に合成を委託、以下の配列を使用した。Forward Primer: 5'-GCAAGATGGCCGCGCTGA-3' Reverse Primer: 5'-CACTCCTGCCTCAGGTCCC-3' VCP の発現には、当研究室において作製された pCMX-FLAG-VCP を使用した。PEX19 ノックダウン用 siRNA は Stealth Select RNAi (Invitrogen) の HSS108913 および HSS108914 を入手し、使用した。

3-2-2 : 抗体

以下の抗体を各メーカーから購入し、免疫沈降およびウェスタンブロット、細胞染色に使用した。anti-actin (chemicon)、anti-catalase (Calbiochem)、anti-ACOT8 (santa cruz)、anti-PEX19 (BD Pharmingen)、anti-HA (santa cruz)、anti-FLAG M2 (sigma)、anti-rabbit IgG Alexa 488 conjugated (Molecular probes)。抗 VCP 抗体(ウサギ血清)は当研究室にて作製されたものを用いた(Hirabayashi *et al.* 2001)。

3-2-3 : 免疫沈降

HEK293A 細胞を用い、pCMV-HA-PEX19 および pCMX-FLAG-VCP のトランスフェクションにより HA-PEX19 および FLAG-VCP を発現させた。24 時間後 PBS で 2 回洗浄を行い、可溶化バッファー(50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 2mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 1% protease inhibitor

cocktail)を添加して溶解させた。20400g、4°C にて 30 分間遠心した後、上清を回収、Dc protein assay kit (Bio Rad)を用いてタンパク定量を行い、サンプル間でのタンパク濃度が均一になるよう希釈調整した。一部を whole cell lysate サンプルとして分取した後、サンプルに抗 HA 抗体あるいは抗 FLAG 抗体を添加し、4°C にて一晩、回転盤で緩やかに攪拌、さらに protein G-Sepharose beads (GE Healthcare)を添加、4°C にて 1 時間回転盤で緩やかに攪拌した。上清を除去後、洗浄バッファー(50mM Tris-HCl (pH 7.5), 250mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.05% deoxycholate)を添加し、4°C で 5 分間、回転盤で緩やかに攪拌し、ビーズの洗浄を行った。再度洗浄操作を行った後に上清を除去、SDS サンプルバッファー(62.5 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% glycerol; 1% 2-mercaptoethanol; 0.02 % bromophenol blue) を添加して 100°C にて 3 分間加熱処理を行い、上清を回収した。得られた免疫沈降サンプルおよび whole cell lysate サンプルを第一章に記載の方法に従い、SDS-PAGE にて展開、ウェスタンブロットを行った。whole cell lysate は 10μg/well、免疫沈降サンプルは 10μl/well を使用した。

その他の材料、方法については前章に記載の内容と同様。

3-3: 結果

<結果の概要>

HEK293 細胞における VCP の過剰発現系を用いた免疫沈降実験において、VCP と PEX19 の相互作用が確認された。HeLa 細胞において PEX19 ノックダウンを行うとペルオキシソーム内腔タンパク catalase の局在異常が生じたが、ペルオキシソーム内腔タンパク PTE1 の局在異常は認められなかった。これらのフェノタイプは VCP ノックダウン時の変化と一致するものであった。

3-3-1 : VCP と PEX19 の相互作用

HEK293A 細胞における VCP および PEX19 の過剰発現系を用い、免疫沈降法およびウェスタンブロットにより VCP と PEX19 の相互作用を確認した。VCP の免疫沈降により、僅かではあるものの、VCP が共沈することが確認された(図

9)。同様に、PEX19 の免疫沈降においても、VCP の共沈が確認された。

3-3-2: VCP および PEX19 ノックダウン時のペルオキシソームタンパク局在異常

PEX19 の欠損はペルオキシソーム病と呼ばれる重篤な代謝異常疾患の要因となり、細胞内にペルオキシソームの構造が形成されなくなる(Matsuzono *et al.* 1999)。培養細胞において一過性のノックダウンを行うと、新規に合成されたペルオキシソーム膜タンパクのペルオキシソームへの輸送に異常が生じることが報告されている(Jones *et al.* 2004)。一方、PTE1 のようなペルオキシソーム内腔タンパクの輸送には影響が生じないことが報告されている(Jones *et al.* 2004)。HeLa 細胞で PEX19 ノックダウンを行ったところ、この結果に一致して、PEX19 ノックダウン時に PTE1 の局在異常は生じなかった(図 10 -a、-b)。意外なことに、PEX19 ノックダウンに伴い、PTE1 と同じペルオキシソーム内腔タンパクである catalase の局在異常が認められた(図 10-a、-b)。さらにこれらの変化は、VCP ノックダウンによって生じる変化と一致するものであった(図 10-c)。

3-4: 考察 (小括 3)

3-4-1 : VCP と PEX19 の相互作用

当研究室において独自に同定された翻訳後修飾を模倣した変異体 VCP の相互作用因子を探索した検証から、翻訳後修飾などある特定の条件下にある一部の VCP が PEX19 と相互作用する可能性が想定されていた。実際に、免疫沈降およびウェスタンブロットで検出された PEX19 に共沈する VCP は僅かであり、一部の VCP が PEX19 と相互作用する状態にある、あるいは両者の相互作用は弱いものであると思われる。本検討では VCP および PEX19 を共に過剰発現させた系を用いており、内在性の VCP と PEX19 の相互作用を確認することが課題である。FLAG-VCP のバンドが複数検出されているが、過剰発現系を用いた影響と考えられる。

3-4-2 : VCP および PEX19 ノックダウン時のペルオキシソームタンパク局在異常

PEX19 はペルオキシソーム膜タンパク輸送因子として知られる。ペルオキシ

ソーム内腔タンパクは、ペルオキシソーム膜上の輸送因子を介してペルオキシソーム内に局在することから、PEX19 ノックダウンの影響を間接的に受け、**catalase** や **PTE1** 等のタンパクが局在異常に至る可能性も考えられる。過去の研究において、一過性の PEX19 ノックダウンを行った際ペルオキシソーム内腔タンパクの局在には異常が生じないことが報告されており (Jones *et al.* 2004)、本研究において得られた結果と一致している。これらの結果から、培養細胞を用いた PEX19 ノックダウン系では、ペルオキシソーム内腔タンパクの局在異常に繋がるほどの影響は生じないものと考えられる。

一方、本研究の結果からペルオキシソーム内腔タンパクである **catalase** の局在異常が認められた(図 10)。従って、PEX19 がペルオキシソーム膜タンパクだけでなく、ペルオキシソーム内腔タンパク、特に **catalase** の局在にも関与していることが示唆される。

さらに、PEX19 ノックダウンのペルオキシソーム内腔タンパク局在に対する影響は VCP ノックダウン時と一致するものであること(図 5、10)、VCP と PEX19 の相互作用を示す結果が得られていることから(図 9)、VCP と PEX19 を介した **catalase** のペルオキシソーム局在メカニズムが存在することが予想される。

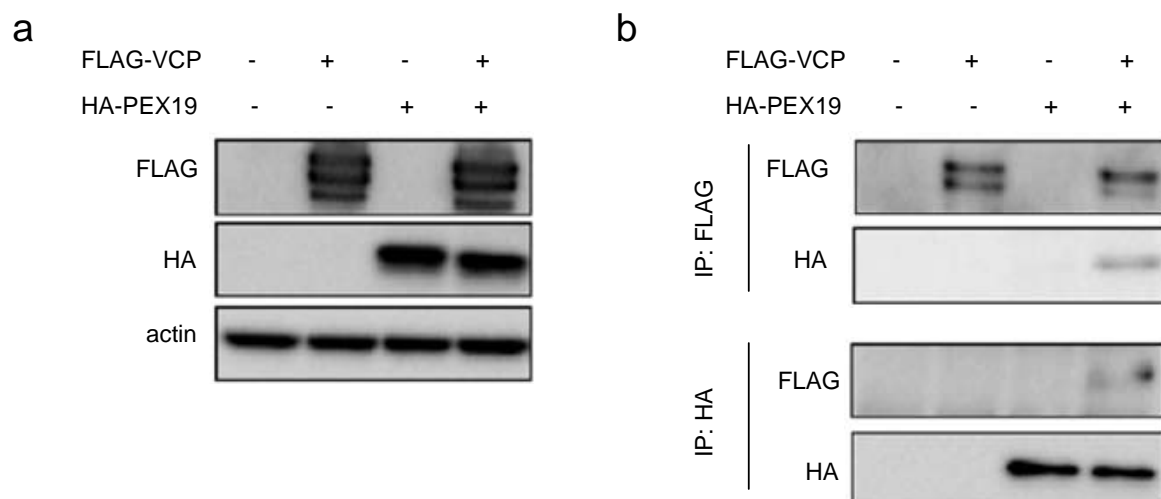
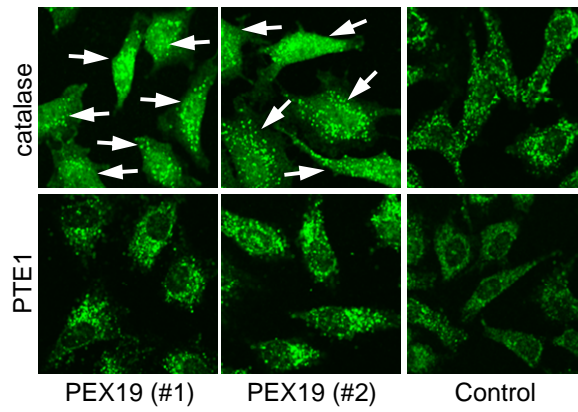


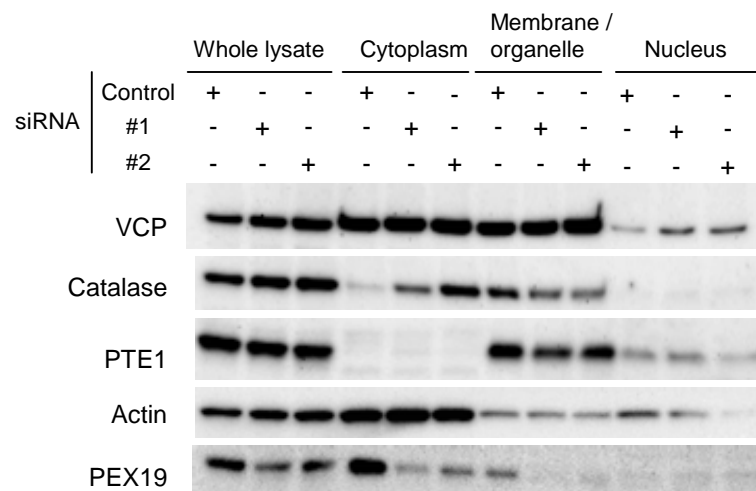
図 9 VCP と PEX19 の相互作用

HEK293A 細胞に FLAG-VCP および HA-PEX19 発現プラスミドを導入、24 時間後に細胞を回収、溶解し、抗 FLAG 抗体もしくは抗 HA 抗体および protein G sepharose ビーズを用いて免疫沈降を行った。a) whole cell lysate および、b) 免疫沈降サンプルを SDS-PAGE により展開し、抗 FLAG 抗体、抗 HA 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。actin はローディングコントロールとして使用した。

a



b



c

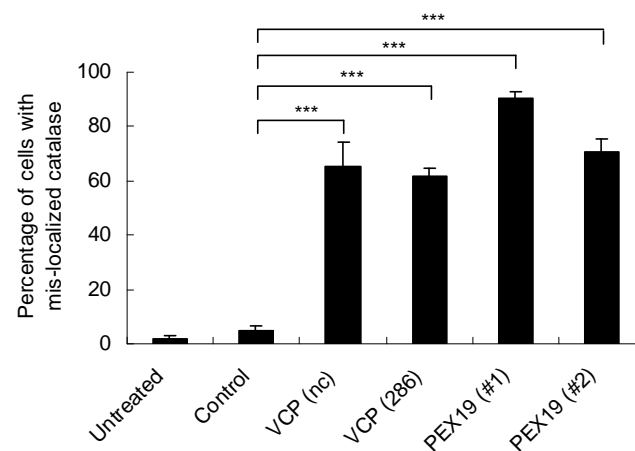


図 10 PEX19 ノックダウンによるペルオキシソーム内腔タンパク局在への影

響

a) HeLa 細胞における catalase および PTE1 の細胞内局在。HeLa 細胞を用い、PEX19 siRNA (#1: HSS108913、および#2: HSS108914)もしくは control siRNA をトランスフェクション、72 時間後に固定、抗 catalase 抗体および抗 ACOT8 (PTE1) 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。矢印は細胞質に catalase が局在する細胞を示す。

b) a)におけるウェスタンブロット。HeLa 細胞に PEX19 siRNA (#1: HSS108913、および#2: HSS108914)もしくは control siRNA をトランスフェクション、72 時間後に細胞分画を行い、細胞質、膜/およびオルガネラ、核成分に分離した。whole cell lysate (7.5μg/well) および whole cell lysate 7.5μg 分に相当する各分画サンプルを SDS-PAGE でポリアクリルアミドゲルに展開、各タンパクに特異的な抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

c) VCP あるいは PEX19 ノックダウン時の細胞質への catalase 局在。HeLa 細胞を用い、VCP siRNA (nc: non-coding、および 286)、PEX19 siRNA (#1: HSS108913、および#2: HSS108914)もしくは control siRNA をトランスフェクション、72 時間後に細胞を固定、抗 catalase 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。各条件 500 細胞以上をカウントし、catalase が細胞質に局在する細胞の割合を算出した、n=3 の平均値を示す。Student's t-test による有意差検定を行った。(エラーバー : S.D 、 ***p < 0.001)

第四章

酸化ストレス下における catalase の 局在変化と VCP の関わり

4-1: 緒言

VCP は、システイン残基の酸化修飾によって ATPase 活性が低下することが明らかになっている(Noguchi *et al.* 2005)。前章までの結果から、VCP が catalase の局在に関与すること、catalase のペルオキシソームへの局在のために、VCP の ATPase 活性が必要であることが示唆された。Catalase はペルオキシソーム内における脂肪酸 β 酸化で発生する H_2O_2 を分解する役割を有する抗酸化酵素であり、細胞質に catalase を過剰発現させた細胞では、酸化ストレス抵抗性を示すことが確認されている(Bai *et al.* 1999)。これらの事象から、酸化ストレス時の VCP の活性低下が catalase の局在変化を起こし、細胞内 ROS レベルの軽減に繋がる一連のメカニズムが予想される。本章では、catalase の局在変化が生じる VCP ノックダウン時の細胞内 ROS レベルの検証、および酸化ストレス誘導時の catalase 局在変化について検証を行った。さらに、酸化修飾の標的となるシステイン残基を置換した変異体 VCP を用い、VCP の酸化修飾との関連性を確認した。これらの検証を通し、VCP および catalase を介した新規の酸化ストレス応答メカニズム、およびヒトの疾患との関連について考察する。

4-2: 材料と方法

4-2-1 : 細胞内 ROS の評価

細胞を PBS にて 2 回洗浄、HBSS で希釈した 5 μ M CM- H_2 DCFDA (Invitrogen) 溶液を加え 37°C の 5% CO_2 インキュベーター内で 30 分間静置した。PBS で 2 回洗浄を行った後、10% FBS を含むダルベッコ変法イーグル培地を添加、 H_2O_2 処理を行うサンプルは、この培地中に 37°C で 30 分間インキュベーションを行った。インキュベーション後、PBS で 2 回洗浄を行い、130 μ l/well のトリプシン溶液で処理。2ml/well の ice cold PBS で細胞を回収、測定に用いるまで氷上で静置した。FACScan (BD Biosciences)で CM- H_2 DCFDA の蛍光シグナルを測定した。

蛍光画像の取得は、35mm 培養ディッシュで上述の薬剤処理を行った後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss)にて 40 倍の水浸対物レンズを用いて観察、画像取得を行った。

4-2-2 : プラスミド

VCP (C522T) の cDNA は過去に当研究室にて作製された発現プラスミドを用いて作製した(Noguchi *et al.* 2005)。変異体 VCP の cDNA を pmCherry-N1 に組み込み、VCP の C 末端側に mCherry を融合させた VCP-mCherry 発現プラスミドを作製した。

その他の材料、方法については前章に記載の内容と同様。

4-3: 結果

<結果の概要>

VCP ノックダウン細胞において、 H_2O_2 処理による細胞内 ROS の上昇が軽減されることが確認され、catalase の細胞質への局在が ROS 低減に繋がる可能性が考えられた。第 2 章の結果および過去の研究成果から、酸化ストレス下では VCP の ATPase 活性が低下し、catalase の局在変化が生じることが想定されたが、これらの予想に一致して、酸化ストレス誘導剤の処理により GFP-KANL および catalase の細胞質への局在が生じた。さらに、酸化修飾抵抗性変異体 VCP (C522T) を発現させた細胞では有意にその局在変化が低減されることが明らかになった。

4-3-1 : VCP ノックダウンに伴う細胞内 ROS レベルの低下

VCP ノックダウンを行った HeLa 細胞において、コントロール細胞に比べ僅かに細胞内 ROS レベルが低下する傾向が見られた(図 11-a)。さらに、 H_2O_2 処理条件においては、VCP ノックダウン細胞の細胞内 ROS レベルがより顕著に低減されることが明らかになった(図 11-b、-c)。

4-3-2 : 酸化ストレス時に見られる GFP-KANL および catalase の局在異常

GFP-KANL 安定発現 HEK293A 細胞において、 H_2O_2 、diamide、 As_2O_3 といった各種 ROS 産生誘導剤の処理によって、GFP の細胞質への局在変化が認められた(図 12 -a、-b)。同様に内在性の catalase においても、これら ROS 産生誘導剤の処理によって細胞質への局在変化が確認された(図 12-c)。酸化ストレス時、転写

因子 Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)を介した抗酸化タンパクの発現誘導が生じる(Dreger *et al.* 2009)。ペルオキシソーム局在タンパクの過剰発現は、catalase のタンパク量が増加することにより、ペルオキシソームへの局在化が十分に見られない可能性が考えられたが、本検証の条件においては catalase のタンパク量の増加は見られなかった(図 12 -d)。

4-3-3 : 酸化ストレスによる GFP-KANL および catalase の局在異常に対する VCP 変異体過剰発現の効果

第 2 章において、catalase のペルオキシソームへの局在化に VCP の ATPase 活性が必要であることが確認された。VCP の ATPase 活性は酸化ストレスによって失われることから(Noguchi *et al.* 2005)、各種 ROS 産生誘導剤の処理によって生じた catalase の局在変化は VCP の酸化修飾を介したものであることが予想された。GFP-catalase を発現させた HEK293A 細胞に H_2O_2 処理を行うと、GFP-catalase の細胞質への局在化が見られたが、VCP の過剰発現により GFP-catalase の局在変化が抑制された(図 13-a、-b)。As₂O₃ 処理によって生じる GFP-catalase の局在変化も VCP の過剰発現により抑制され、酸化修飾抵抗性変異体(C522T)を発現させた細胞では野生型に比べ有意に抑制効果が見られた (図 13-c)。

4-4: 考察 (小括 4)

4-4-1 : VCP ノックダウンに伴う細胞内 ROS レベルの低下

H_2O_2 処理を行わない状態においては、VCP ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ僅かに細胞内 ROS レベルが低下している傾向が見られるが、顕著な差は見られない。一方、 H_2O_2 処理時には VCP ノックダウン細胞において明らかな ROS の低下が見られることから、catalase が細胞質に局在する状態は、過剰に存在する H_2O_2 に対して防御的に機能することが予想される。

4-4-2 : 酸化ストレス時に見られる GFP-KANL および catalase の局在異常

ROS 産生誘導剤によって VCP の ATPase 活性が低下することが過去の研究において確認されており (Noguchi *et al.* 2005)、第 2 章において catalase のペルオキ

シソームへの局在に VCP の ATPase 活性が必要であることが確認されていることから、酸化ストレス下生じる catalase の局在変化は、これらの知見に一致する現象である。ROS 産生誘導剤処理後の細胞において catalase のタンパク量に顕著な増加が見られないことから、酸化ストレス下で生じる catalase の局在変化は、catalase の過剰発現に伴う細胞質への局在量増加ではなく、ペルオキシソームへの局在化が低下したことによる変化であると推察される。

4-4-3：酸化ストレスによる catalase の局在異常に対する VCP 変異体過剰発現の効果

ROS 産生誘導剤によって生じた catalase の局在変化が、VCP の過剰発現で軽減されたこと、特に、As₂O₃ 処理による酸化修飾抵抗性変異体(C522T)の発現によって有意に catalase の細胞質局在が減少したことから、酸化ストレス下で生じる catalase の局在変化は、VCP の酸化修飾を介したものと考えられる。VCP は種間で高度に保存されたタンパクであるが、522 番目のシステイン残基は出芽酵母においては保存されていない(Noguchi *et al.*, 2005)。また、出芽酵母や線虫においては細胞質局在型の catalase が存在するが、哺乳類の細胞ではペルオキシソーム局在型のみが存在することが知られている(Cohen *et al.*, 1988; Frugoli *et al.* 1996; Hartig *et al.*, 1986; Togo *et al.* 2000)。これらの知見を考え合わせると、酸化修飾を受ける VCP を有する生物では、ペルオキシソーム局在型の catalase のみを有している傾向が見てとれる(図 14)。

細胞内において H₂O₂ はシグナル分子として利用されている(Funato *et al.* 2010; Veal *et al.*, 2007)。Catalase の局在変化による ROS 調節機構は、細胞に対する ROS の負荷、特に H₂O₂ の量を適切にコントロールするための機構であり、高等動物における細胞内の複雑なシグナル経路を維持、調節するために寄与しているかもしれない。

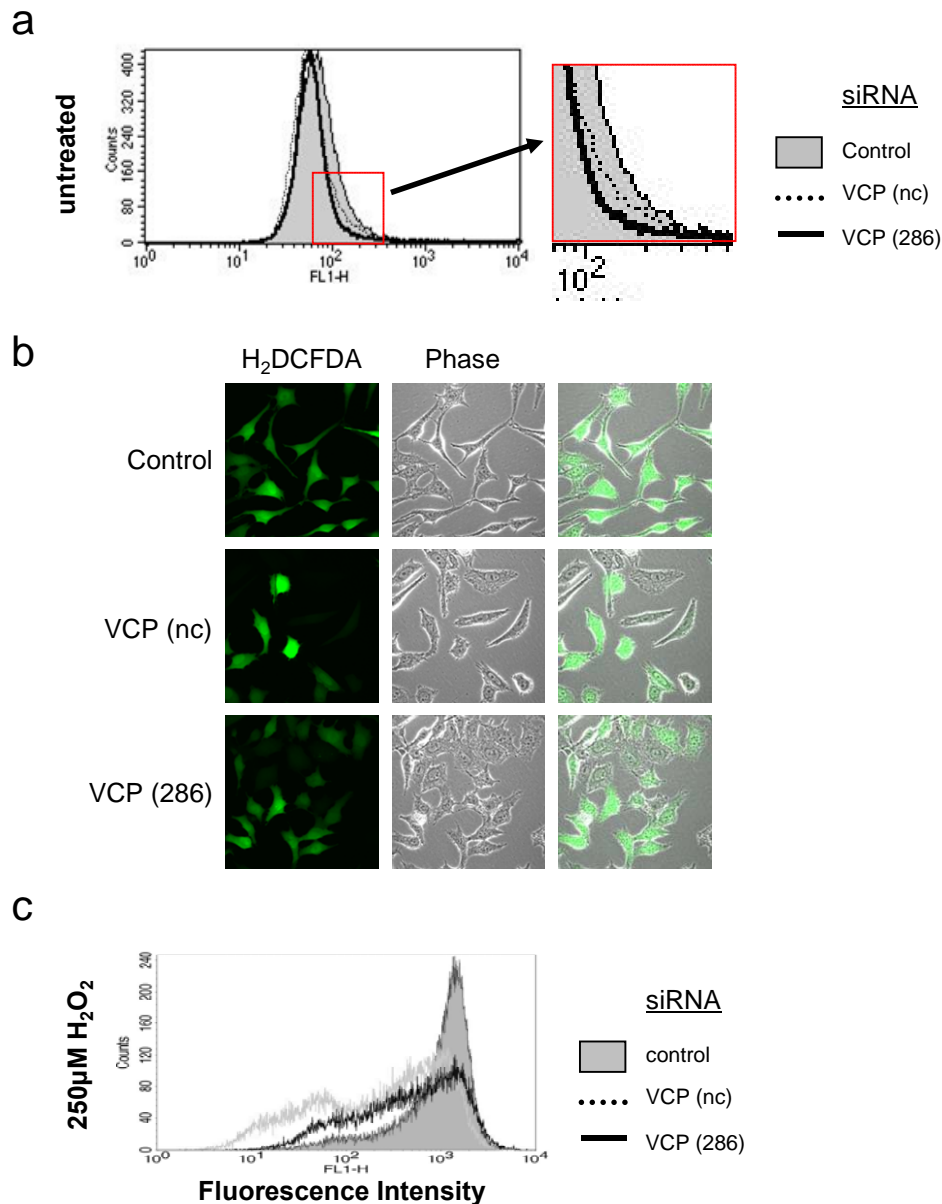


図 11 VCP ノックダウンに伴う細胞内 ROS レベルの低下

a) VCP ノックダウン時の細胞内 ROS レベル。HeLa 細胞に VCP siRNA (nc: non-coding、および 286)、もしくは control siRNA をトランスフェクションした。48 時間後に 5μM の H₂DCFDA を含む培地で 30 分間培養した後、FACS を用いて蛍光シグナルを検出した。

b) H₂O₂ 処理時の HeLa 細胞の細胞内 ROS レベル。HeLa 細胞に VCP siRNA (nc: non-coding、および 286)、もしくは control siRNA をトランスフェクションした。48 時間後に 5μM の H₂DCFDA を含む培地で 30 分間培養した後、250μM の H₂O₂ で 30 分間処理、共焦点レーザー顕微鏡で H₂DCFDA の緑色蛍光を観察した。

c) b)に示す H₂O₂ 処理時の HeLa 細胞の細胞内 ROS レベルの FACS 解析。

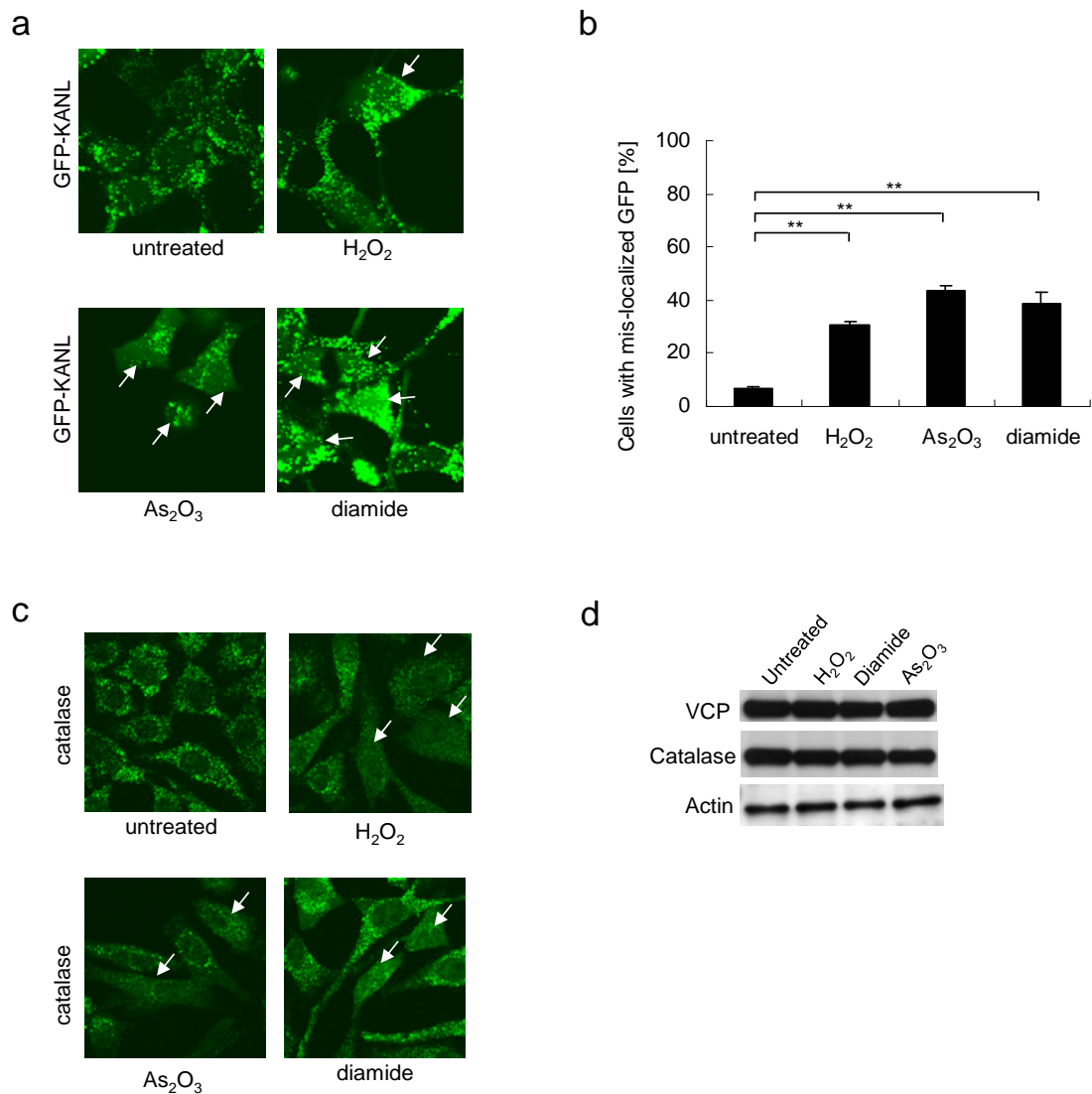


図 12 酸化ストレス時に見られる GFP-KANL および catalase の局在異常

a) ROS 産生誘導剤による GFP-KANL の局在変化。GFP-KANL 安定発現 HEK293A 細胞株を用い、250 μ M の H_2O_2 、20nM の As_2O_3 、あるいは 250 μ M diamide を含む培地で培養した。24 時間後、共焦点レーザー顕微鏡を用い、生細胞の状態で GFP-KANL の局在を確認した。矢印は GFP の細胞質への局在が見られる細胞を示す。

b) a)に示す ROS 酸性誘導剤による GFP-KANL 局在異常の評価。a)と同条件にて GFP-KANL 安定発現 HEK293A 細胞株を処理した後、各条件 200 細胞以上をカウントした。GFP-KANL が細胞質に局在する細胞の割合を算出、n=3 の平均値を示す。Student's t-test による有意差検定を行った。(エラーバー:S.D 、**p < 0.01)

c) ROS 産生誘導剤による catalase の局在変化。HeLa 細胞を用い、500 μ M の H_2O_2 、20nM の As_2O_3 、あるいは 250 μ M diamide を含む培地で培養した。24 時間後に固定、抗 catalase 抗体による免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて catalase の局在を確認した。矢印は catalase の細胞質への局在が見られる細胞を示す。

d) ROS 産生誘導剤処理時の catalase タンパク量。HEK293A 細胞を用い、500 μ M の H_2O_2 、20nM の As_2O_3 、あるいは 250 μ M diamide を含む培地で培養した。24 時間後に細胞を回収、サンプルを SDS-PAGE で展開し、抗 VCP 抗体および抗 catalase 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。Actin はローディングコントロールとして検出した。

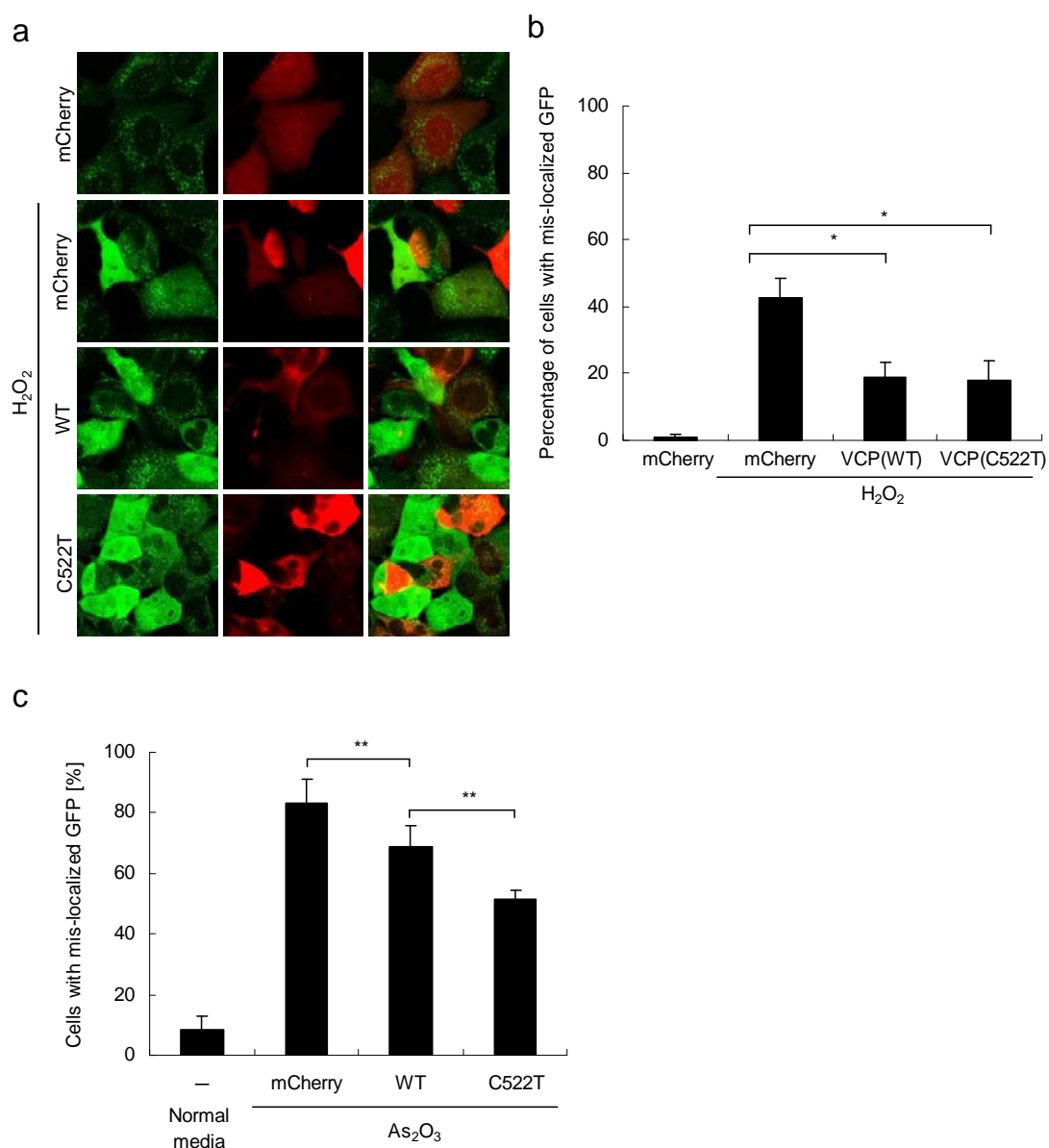


図 13 酸化ストレスによる catalase の局在異常に対する VCP 変異体過剰発現の効果

a) H₂O₂ 処理時の catalase 局在異常に対する VCP 過剰発現の効果。GFP-catalase 安定発現 HEK293A 細胞を用い、トランスフェクションにより各種 VCP-mCherry を発現させた後、500μM の H₂O₂ を含む培地中で培養した。24 時間後、共焦点レーザー顕微鏡を用い生細胞の状態で GFP-catalase および VCP-mCherry の蛍光像を取得した。

b) a)に示す catalase の細胞内局在の評価。各条件 300 細胞以上をカウントし、GFP-catalase の局在異常を伴う細胞の割合を算出した n=3 の平均値を示す。Student's t-test による有意差検定を行った。(エラーバー : S.D 、 * $p < 0.05$)

c) As₂O₃ 処理時の GFP-catalase 局在異常に対する VCP 過剰発現の効果。GFP-KANL 安定発現 HEK293A 細胞を用い、トランスフェクションにより mCherry あるいは VCP-mCherry を発現させた後、20 μ M の As₂O₃ を含む培地中で培養した。24 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用い生細胞の状態での GFP-KANL の局在を確認、各条件 200 細胞以上をカウントし、GFP-KANL の局在異常を伴う細胞の割合を算出した n=3 の平均値を示す。Student's t-test による有意差検定を行った。(エラーバー : S.D 、 ** $p < 0.01$)

peroxisomal catalase	cytosolic catalase		VCP (Cys522)
+	–	<i>Homo sapiens/Mus musculus</i> (VCP)	GPPG C GKTLL
+	–	<i>Xenopus laevis</i> (VCP)	GPPG C GKTLL
+	–	<i>Drosophila melanogaster</i> (TER94)	GPPG C GKTLL
+	+	<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtCDC48)	GPPG C GKTLL
+	+	<i>Caenorhabditis elegans</i> (CDC48.1)	GPPG C GKTLL
		<i>Caenorhabditis elegans</i> (CDC48.2)	GPPG C GKTLL
+	+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CDC48)	GPPG T GKTLL

図 14 各生物種における VCP の 552 番目のシステイン残基の相同性と catalase 局在部位の比較

酸化修飾を受ける VCP のシステイン残基周辺のアミノ酸配列、及び catalase の局在部位。VCP および各生物種の VCP ホモログで Cys522 に相当するアミノ酸残基を黒色の背景で示す。

総括

総括

本研究では、VCP のペルオキシソームタンパク輸送への関与、および VCP の酸化修飾と catalase の局在変化を介した酸化ストレスに対するフィードバックメカニズムを明らかにした。第 1 章では、VCP の RNAi および各種オルガネラマーカーGFP 発現細胞株を用いた live cell イメージングによる解析から、VCP のペルオキシソームへの関与を見出した。また、内在性ペルオキシソームタンパクに対する VCP ノックダウンの影響について検討を行い、VCP が catalase のペルオキシソーム局在に必要であることを明らかにした。第 2 章では、VCP の ATPase 活性が catalase のペルオキシソームへの局在化に必要であること、VCP は既知のペルオキシソーム内腔タンパク輸送因子 PEX5 とは相補的な機能を有していないことを確認した。第 3 章では、VCP とペルオキシソーム形成因子 PEX19 との相互作用、および各ノックダウンフェノタイプの比較を行った。免疫沈降法を用いた相互作用解析により、VCP と PEX19 の相互作用が示された。また、PEX19 ノックダウンにより catalase の局在異常が生じ、典型的なペルオキシソーム局在配列(-SKL)を持つ PTE1 の局在には影響を与えないという、VCP ノックダウンと同様のフェノタイプが得られることを見出した。第 4 章では、酸化ストレス下における catalase 局在変化と VCP の関わりについて検証を行い、VCP の酸化修飾によって catalase の局在変化が生じることを明らかにした。

これらの知見から、ヒトと出芽酵母の間で異なる VCP の 522 番目のシステイン残基の酸化修飾による VCP の活性調節機構と、catalase 局在のバリエーションという 2 つの事象を結びつけるモデルを提示するに至った。細胞内の ROS が上昇すると VCP が酸化修飾を受け catalase のペルオキシソーム局在性が低下、細胞質の catalase が増加し、 H_2O_2 の分解を促進することにより ROS の軽減に繋がるという、VCP の酸化修飾と catalase の局在変化を介した酸化ストレスに対するフィードバックメカニズムである(図 15)。当研究室において、VCP は異常タンパクの蓄積に対し、タンパク合成の抑制を介したフィードバック機構を担うことが明らかにされていることから(Koike *et al.* 2010)、VCP は様々なストレスに対するフィードバック機構に関わる鍵分子であることが推察される。

本研究で明らかになったフィードバック機構と、ヒトの各種疾患の発症や悪性化との関連性については今後詳細な検証が必要であるが、いくつか興味深い

知見が報告されている。当研究室において、高い ATPase 活性を有する VCP 変異体(T761E)を全身発現させたショウジョウバエは短命となることが明らかにされている。また、骨パジェット病と前側頭葉型痴呆を伴う遺伝性封入体筋炎 IBMPFD の原因となる変異型 VCP は、同様に ATPase 活性が亢進していることが知られている。VCP の ATPase 活性が亢進した状態では catalase の局在変化によるフィードバック機構が機能し難くなることが想定され、IBMPFD における種々の組織障害の要因となっているかもしれない。

VCP を過剰発現させた細胞では、酸化修飾抵抗性変異体(C522T) VCP のみならず、野生型 VCP においても酸化ストレスによる GFP-catalase の細胞質局在化が軽減された(図 13)。癌細胞では ROS が上昇していること(Szatrowski & Nathan 1991)、癌細胞における ROS の上昇によって protein kinase C を介した癌の進展に繋がることが報告されていることなどから(Hu *et al.* 2011)、上皮系癌組織で認められる VCP の過剰発現は、VCP の関わる酸化ストレスのフィードバック機構の破綻に繋がり、癌の悪性化に寄与しているかもしれない。

本研究で得られた知見は、ペルオキシソームの基礎的な研究に貢献することが期待される。ペルオキシソーム膜タンパク輸送因子として知られていた PEX19 がペルオキシソーム内腔タンパクである catalase の輸送にも関わることが示唆され、ペルオキシソームタンパク輸送系の複雑さが明らかになった。また、従来脂質代謝の場として理解されてきたペルオキシソームが、酸化ストレス応答の機能に関わるオルガネラであるという、新たな観点が得られている。Catalase の細胞質への局在化は老化した線維芽細胞において確認されており(Legakis *et al.* 2002)、その詳細なメカニズムは不明であったが、VCP の酸化修飾がその要因となっているかもしれない。

H₂O₂ は細胞の生体分子を酸化損傷することがよく知られているが、細胞内のシグナル伝達分子としての役割を担うことが明らかにされている(Buettner 2011; Veal *et al.* 2007; Valko *et al.* 2007)。本研究において新たな H₂O₂ の調節機構が明らかになったことにより、H₂O₂ を介した細胞内シグナル伝達の理解、さらには細胞の老化や、酸化ストレスに起因する各種疾患メカニズムの基礎的な理解に繋がることが期待される。

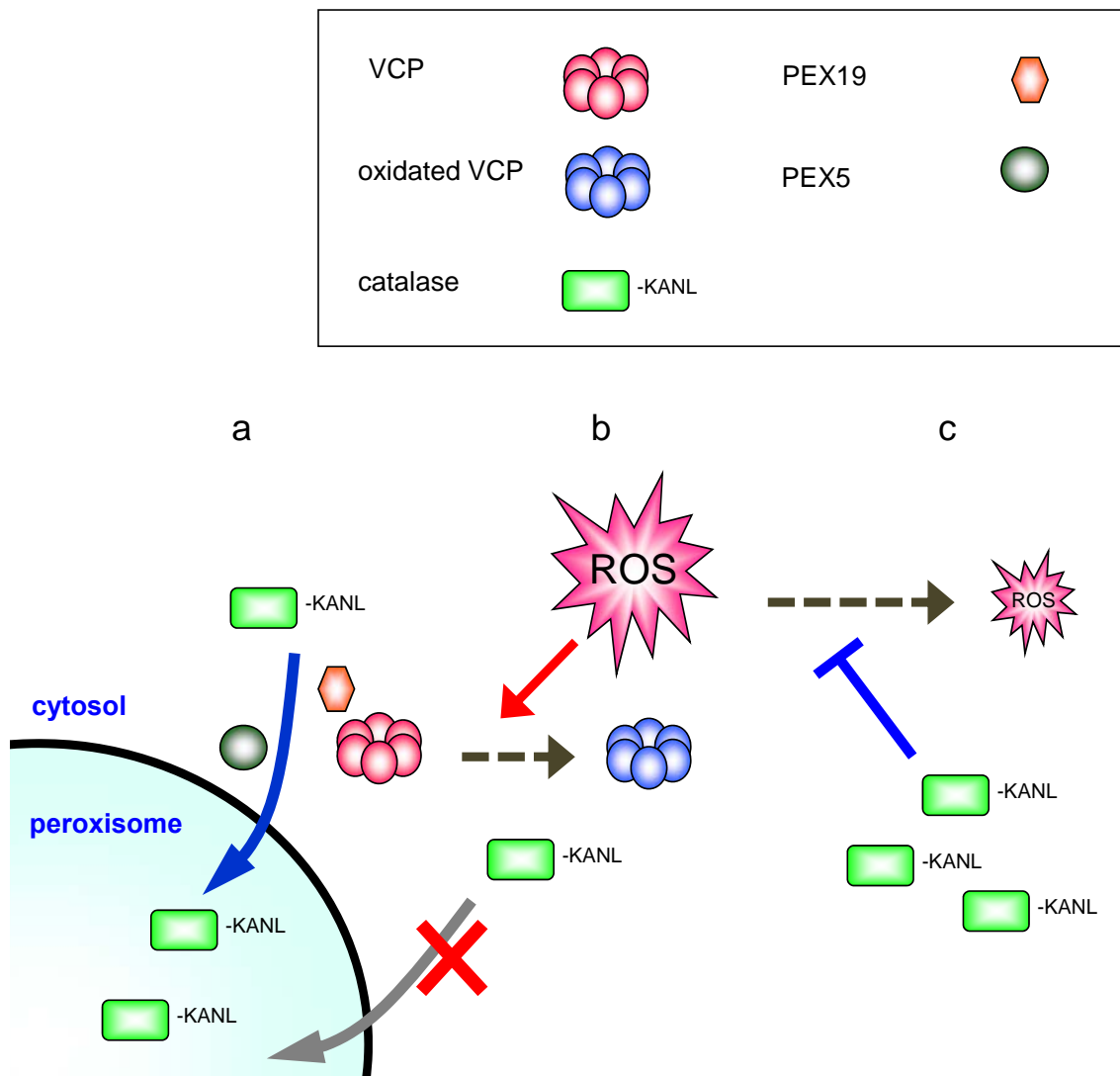


図 15 VCP を介した酸化ストレスフィードバック機構モデル

- a) 通常状態における catalase のペルオキシソーム内腔への輸送。catalase はペルオキシソーム内腔タンパク輸送因子 PEX5 に加え、VCP および PEX19 を介してペルオキシソーム内腔に輸送される。
- b) ROS による VCP の酸化修飾と catalase の局在変化。細胞内に過剰な ROS が生じた場合、酸化修飾により VCP の ATPase 活性が低下、新たに翻訳合成された catalase のペルオキシソームへの輸送レベルが低下し、細胞質に局在する catalase が増加する。
- c) 細胞質 catalase による ROS の低減。細胞質に局在した catalase が過剰な H_2O_2 を分解、細胞内 ROS の低減および通常状態への回復に寄与する。

参考文献

参考文献

- Bai, J., Rodriguez, A. M., Melendez, J. A. & Cederbaum, A. I. (1999) Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J Biol Chem.* 274, 26217-24.
- Buettner, G. R. (2011) Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem.* 11, 341-6.
- Cohen, G., Rapatz, W. & Ruis, H. (1998) Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur J Biochem.* 176, 159-63.
- Chou, T. F., Brown, S. J., Minond, D., Nordin, B. E., Li, K., Jones, A. C., Chase, P., Porubsky, P. R., Stoltz, B. M., Schoenen FJ, Patricelli MP, Hodder P, Rosen H, Deshaies RJ. (2011) Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 4834-9.
- Crookes, W. J. & Olsen, L. J. (1998) The effects of chaperones and the influence of protein assembly on peroxisomal protein import. *J Biol Chem.* 273, 17236-42..
- Dammai, V. & Subramani, S. (2001) The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell.* 105, 187-96.
- Dreger, H., Westphal, K., Weller, A., Baumann, G., Stangl, V., Meiners, S. & Stangl, K. (2009) Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 83, 354-61.
- Dreveny, I., Pye, V. E., Beuron, F., Briggs, L. C., Isaacson, R. L., Matthews, S. J., McKeown, C., Yuan, X., Zhang, X. & Freemont, P. S. (2004) p97 and close encounters of every kind: a brief review. *Biochem Soc Trans.* 32, 715-20.
- Fröhlich, K. U., Fries, H. W., Rüdiger, M., Erdmann, R., Botstein, D. & Mecke, D. (1991) Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J Cell Biol.* 114, 443-53.
- Frugoli, J. A., Zhong, H. H., Nuccio, M. L., McCourt, P., McPeck, M. A., Thomas, T. L.

- & McClung, C. R. (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 112, 327-36.
- Funato, Y. & Miki, H. (2010) Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin. *Free Radic Biol Med.* 44, 379-88.
- Hanson, P. I. & Whiteheart, S. W. (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 519-29.
- Harano, T., Nose, S., Uezu, R., Shimizu, N. & Fujiki, Y. (2001) Hsp70 regulates the interaction between the peroxisome targeting signal type 1 (PTS1)-receptor Pex5p and PTS1. *Biochem J.* 357, 157-65.
- Hartig, A. & Ruis, H. (1986) Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *Eur J Biochem.* 160, 487-90.
- Heiland, I. & Erdmann, R. (2005) Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* 272, 2362-72.
- Heo, J. M., Livnat-Levanon, N., Taylor, E. B., Jones, K. T., Dephoure, N., Ring, J., Xie, J., Brodsky, J. L., Madeo, F., Gygi, S. P., Ashrafi, K., Glickman, M. H. & Rutter, J. (2010) A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Mol Cell.* 40, 465-80.
- Hettema, E. H., Ruigrok, C. C., Koerkamp, M. G., van den Berg, M., Tabak, H. F., Distel, B. & Braakman, I. (1998) The cytosolic DnaJ-like protein djplp is involved specifically in peroxisomal protein import. *J Cell Biol.* 142, 421-34.
- Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A., H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Uchiyama, Y., Hori, S. & Kakizuka A. (2001) VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 8, 977-84.
- Hu, C. T., Wu, J. R., Cheng, C. C., Wang, S., Wang, H. T., Lee, M. C., Wang, L. J., Pan, S. M., Chang, T. Y. & Wu, W. S. (2011) Reactive oxygen species-mediated PKC and integrin signaling promotes tumor progression of human hepatoma HepG2. *Clin Exp Metastasis.* 28, 851-63.
- Johnson, J. O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van, Deerlin, V. M.,

- Trojanowski, J, Q., Gibbs, J, R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., Ding, J., McCluskey, L., Martinez-Lage, M., Falcone, D., Hernandez, D, G., Arepalli, S., Chong, S., Schymick, J, C., Rothstein, J., Landi, F., Wang, Y, D., Calvo, A., Mora, G., Sabatelli, M., Monsurrò, M, R., Battistini, S., Salvi, F., Spataro, R., Sola, P., Borghero, G.; ITALSGEN Consortium., Galassi, G., Scholz, S, W., Taylor, J, P., Restagno, G., Chiò, A. & Traynor, B, J. (2010) Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*. 857, 857-64.
- Jones, J,M., Morrell, J,C. & Gould, S,J. (2004) PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol*. 164, 57-67..
- Kakizuka, A. (2008) Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. *Biochem Soc Trans*. 36, 105-8.
- Kano, F., Kondo, H., Yamamoto, A., Kaneko, Y., Uchiyama, K., Hosokawa, N., Nagata, K. & Murata M. (2005) NSF/SNAPs and p97/p47/VCIP135 are sequentially required for cell cycle-dependent reformation of the ER network. *Genes Cells*. 10, 989-99.
- Kobayashi, T., Tanaka, K., Inoue, K. & Kakizuka, A. (2002) Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J Biol Chem*. 277, 47358-65.
- Kobayashi, T., Manno, A. & Kakizuka, A. (2007) Involvement of valosin-containing protein (VCP)/p97 in the formation and clearance of abnormal protein aggregates. *Genes Cells*. 12, 889-901.
- Koike, M., Fukushi, J., Ichinohe, Y., Higashimae, N., Fujishiro, M., Sasaki, C., Yamaguchi, M., Uchihara, T., Yagishita, S., Ohizumi, H., Hori, S. & Kakizuka A. (2010) Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. *J Biol Chem*. 285, 21736-49.
- Koller, K, J. & Brownstein, M, J. (1987) Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin. *Nature*. 325, 542-5.
- Koppers, M., van Blitterswijk, M,M., Vlam, L., Rowicka, P, A., van Vught, P, W., Groen,

- E, J., Spliet, W. G., Engelen-Lee, J., Schelhaas, H. J., de Visser, M., van der Kooi, A., J., van der Pol, W. L., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H. & van den Berg, L. H. (2012) VCP mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 837, e7-13.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S. & Walter, P. (2009) An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 325, 477-81.
- Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T. P., Pappin, D., Freemont, P. & Warren, G. (1997) p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature*. 388, 75-8.
- Legakis, J. E., Koepke, J. I., Jedeszko, C., Barlasakar, F., Terlecky, L. J., Edwards, H. J., Walton, P. A., Terlecky, S. R. (2002) Peroxisome senescence in human fibroblasts. *Mol Biol Cell* 13, 4243-55.
- Lu, H., Yang, Y., Allister, E. M., Wijesekara, N. & Wheeler, M. B. (2008) The identification of potential factors associated with the development of type 2 diabetes: a quantitative proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*. 7, 1434-51.
- Manno, A., Noguchi, M., Fukushi, J., Motohashi, Y. & Kakizuka, A. (2010) Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Genes Cells*. 15, 911-22.
- Matsuzono, Y., Kinoshita, N., Tamura, S., Shimozawa, N., Hamasaki, M., Ghaedi, K., Wanders, R. J., Suzuki, Y., Kondo, N. & Fujiki, Y. (1999) Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 2116-21.
- Maynard, E. L., Gatto, G. J. Jr. & Berg, J. M. (2004) Pex5p binding affinities for canonical and noncanonical PTS1 peptides. *Proteins*. 55, 856-61.
- Meyer, H., Drozdowska, A. & Dobrynin, G. (2010) A role for Cdc48/p97 and Aurora B in controlling chromatin condensation during exit from mitosis. *Biochem Cell Biol*. 88, 23-8.

- Mori-Konya, C., Kato, N., Maeda, R., Yasuda, K., Higashimae, N., Noguchi, M., Koike, M., Kimura, Y., Ohizumi, H., Hori, S. & Kakizuka, A. (2009) p97/valosin-containing protein (VCP) is highly modulated by phosphorylation and acetylation. *Genes Cells*. 14, 483-97.
- Natsume, T., Yamauchi, Y., Nakayama, H., Shinkawa, T., Yanagida, M., Takahashi, N. & Isobe, T. (2002) A direct nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for interaction proteomics. *Anal Chem*. 74, 4725-33.
- Noguchi, M., Takata, T., Kimura, Y., Manno, A., Murakami, K., Koike, M., Ohizumi, H., Hori, S. & Kakizuka, A. (2005) ATPase activity of p97/valosin-containing protein is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved cysteine 522 residue in Walker A motif. *J Biol Chem*. 280, 41332-41.
- Pamnani, V., Tamura, T., Lupas, A., Peters, J., Cejka, Z., Ashraf, W. & Baumeister, W. (1997) Cloning, sequencing and expression of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett*. 404, 263-8.
- Petriv, O.I. & Rachubinski, R. A. (2004) Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 279, 19996-20001.
- Purdue, P. E. & Lazarow, P. B. (1996) Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *J Cell Biol*. 134, 849-62.
- Ruden DM, Sollars V, Wang X, Mori D, Alterman M, Lu X. (2000) Membrane fusion proteins are required for oskar mRNA localization in the *Drosophila* egg chamber. *Dev Biol*. 218, 314-25.
- Rumpf, S., Lee, S, B., Jan, L, Y. & Jan, Y, N. (2011) Neuronal remodeling and apoptosis require VCP-dependent degradation of the apoptosis inhibitor DIAP1. *Development*. 138, 1153-60.
- Schrader, M. & Fahimi, H. D. (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 1763, 1755-66.
- Shiozawa, K., Goda, N., Shimizu, T., Mizuguchi, K., Kondo, N., Shimozawa, N., Shirakawa, M. & Hiroaki, H. (2006) The common phospholipid-binding activity of the N-terminal domains of PEX1 and VCP/p97. *FEBS J*. 273, 4959-71.

- Szatrowski, T. P. & Nathan, C. F. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 51, 794-8.
- Tiloca, C., Ratti, A., Pensato, V., Castucci, A., Sorarù, G., Del, Bo, R., Corrado, L., Cereda, C., D'Ascenzo, C., Comi, G. P., Mazzini, L., Castellotti, B., Ticozzi, N., Gellera, C., Silani, V. & SLAGEN Consortium. (2012) Mutational analysis of VCP gene in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 33, 630.e1-2.
- Titorenko, V. I. & Mullen, R. T. (2006) Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. *J Cell Biol.* 174, 11-7.
- Togo, S. H., Maebuchi, M., Yokota, S., Bun-Ya, M., Kawahara, A. & Kamiryo, T. (2000) Immunological detection of alkaline-diaminobenzidine-negative peroxisomes of the nematode *Caenorhabditis elegans* purification and unique pH optima of peroxisomal catalase. *Eur J Biochem.* 267, 1307-12.
- Tsujimoto, Y., Tomita, Y., Hoshida, Y., Kono, T., Oka, T., Yamamoto, S., Nonomura, N., Okuyama, A. & Aozasa, K. (2004) Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 10, 3007-12.
- Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S., Hashimoto, T. & Osumi, T. (1994) Characterization of the signal peptide at the amino terminus of the rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase precursor. *J Biol Chem.* 269, 6001-10.
- Uchiyama, K., Jokitalo, E., Kano, F., Murata, M., Zhang, X., Canas, B., Newman, R., Rabouille, C., Pappin, D., Freemont, P. & Kondo H. (2002) VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. *J Cell Biol.* 159, 855-66.
- Uchiyama, K., Totsukawa, G., Puhka, M., Kaneko, Y., Jokitalo, E., Dreveny, I., Beuron, F., Zhang, X., Freemont, P. & Kondo H. (2006) p37 is a p97 adaptor required for Golgi and ER biogenesis in interphase and at the end of mitosis. *Dev Cell.* 11, 755-7.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. & Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 44-84.

- Valle, C. W., Min, T., Bodas, M., Mazur, S., Begum, S., Tang, D. & Viji, N. (2011) Critical Role of VCP/p97 in the Pathogenesis and Progression of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *PLoS One*. 6, e29073.
- Veal, E. A., Day, A. M. & Morgan, B. A. (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*. 26, 1-14.
- Vembar, S. S. & Brodsky, J. L. (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9, 944-57.
- Wanders, R. J. & Waterham, H. R. (2006) Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem*. 75, 295-332.
- Wang, Y., Ballar, P., Zhong, Y., Zhang, X., Liu, C., Zhang, Y. J., Monteiro, M. J., Li, J. & Fang, S. (2011) SVIP induces localization of p97/VCP to the plasma and lysosomal membranes and regulates autophagy. *PLoS One*. 6, e24478.
- Watts, G. D., Wymer, J., Kovach, M. J., Mehta, S. G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M. P. & Kimonis, V. E. (2004) Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet*. 36, 377-81.
- Williams, K. L., Solski, J. A., Nicholson, G. A. & Blair, I. P. (2012) Mutation analysis of VCP in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 1488, e15-6.
- Wójcik, C., Yano, M. & DeMartino, G. N. (2004) RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci*. 117, 281-92.
- Yamamoto, S., Tomita, Y., Hoshida, Y., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Yasuda, T., Yano, M., Nakamori, S., Sakon, M., Monden, M. & Aozasa, K. (2003a) Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 21, 2537-44.
- Yamamoto, S., Tomita, Y., Nakamori, S., Hoshida, Y., Nagano, H., Dono, K., Umeshita, K., Sakon, M., Monden, M. & Aozasa, K. (2003b) Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence. *J Clin Oncol*. 21, 447-52.

- Yamamoto, S., Tomita, Y., Hoshida, Y., Iizuka, N., Kidogami, S., Miyata, H., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Yasuda, T., Yano, M., Nakamori, S., Sakon, M., Monden, M. & Aozasa, K. (2004a) Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 10, 5558-65.
- Yamamoto, S., Tomita, Y., Hoshida, Y., Iizuka, N., Monden, M., Yamamoto, S., Iuchi, K. & Aozasa, K. (2004b) Expression level of valosin-containing protein (p97) is correlated with progression and prognosis of non-small-cell lung carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 11, 697-704.
- Yamamoto, S., Tomita, Y., Hoshida, Y., Nagano, H., Dono, K., Umeshita, K., Sakon, M., Ishikawa, O., Ohigashi, H., Nakamori, S., Monden, M. & Aozasa, K. (2004c) Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 11, 165-72.
- Yamamoto, S., Tomita, Y., Hoshida, Y., Sakon, M., Kameyama, M., Imaoka, S., Sekimoto, M., Nakamori, S., Monden, M. & Aozasa, K. (2004d) Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis. *Clin Cancer Res.* 10, 651-7.
- Yamamoto, S., Tomita, Y., Nakamori, S., Hoshida, Y., Iizuka, N., Okami, J., Nagano, H., Dono, K., Umeshita, K., Sakon, M., Ishikawa, O., Ohigashi, H., Aozasa, K. & Monden, M. (2004e) Valosin-containing protein (p97) and Ki-67 expression is a useful marker in detecting malignant behavior of pancreatic endocrine neoplasms. *Oncology.* 66, 468-75.
- Yamamoto, S., Tomita, Y., Uruno, T., Hoshida, Y., Qiu, Y., Iizuka, N., Nakamichi, I., Miyauchi, A. & Aozasa, K. (2005) Increased expression of valosin-containing protein (p97) is correlated with disease recurrence in follicular thyroid cancer. *Ann Surg Oncol.* 12, 925-34.
- Yamanaka, K., Sasagawa, Y. & Ogura, T. (2012) Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim Biophys Acta.* 1823, 130-7.

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、本学生命科学研究科 高次生命科学専攻 高次生体統御学分野教授 垣塚彰先生に終始暖かいご指導、ご鞭撻を頂きました。修士課程入学以来、長期にわたり懇切にご指導いただきましたことを心より感謝申し上げます。在学中、貴重なご指導、ご助言を頂きました本学生命科学研究科 高次生命科学専攻 高次生体統御学分野講師 堀清次先生、同助教 大泉宏先生に心より感謝申し上げます。

実験の実施にあたり、高次生体統御学分野 小池雅昭博士、一戸勇弦氏、笹岡紀男氏にご協力頂いたことをここに記すとともに、厚く御礼申し上げます。

質量分析に関して、産業技術総合研究所 バイオメディシナル情報研究センター 夏目徹先生（現所属 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター）、家村俊一郎先生（現所属 福島県立医科大学 医療・産業 TR センター）にご協力頂きました。厚く御礼申し上げます。

最後に、在学中に研究生生活を共に過ごさせていただいた高次生体統御学分野の研究室メンバーに心から感謝致します。